

VACUNAS CONTRA EL METAPNEUMOVIRUS HUMANO**SOLICITUDES RELACIONADAS**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Núm. 63/284.405, presentada el 30 de noviembre de 2021, que se incorpora como referencia en su totalidad a todos los efectos.

DECLARACIÓN DE CRADA

Esta invención fue creada en el marco de un Acuerdo de Investigación y Desarrollo Cooperativo (Cooperative Research and Development Agreement) con los Institutos Nacionales de Salud, una Agencia del Departamento de Salud y Servicios Humanos. El Gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre esta invención.

ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

El metapneumovirus humano (hMPV) es una de las principales causas de infección respiratoria aguda, sobre todo en niños, pacientes inmunodeprimidos y ancianos. El hMPV, que está estrechamente relacionado con el metapneumovirus aviar subtipo C, ha circulado durante al menos 65 años, y casi todos los niños estarán infectados por el hMPV a la edad de 5 años. Sin embargo, la inmunidad es incompleta y se producen reinfecciones a lo largo de la vida adulta. Los síntomas son similares a los de otras infecciones virales respiratorias, y van desde los leves (por ejemplo, tos, rinorrea y fiebre) hasta los graves (por ejemplo, bronquiolitis y neumonía).

Actualmente no hay vacunas o terapias autorizadas contra el hMPV, a pesar de la elevada carga de la enfermedad. Debido a la escasez de vacunas o terapias eficaces contra el hMPV, existe la necesidad de vacunas contra el hMPV que provoquen una fuerte respuesta inmunitaria para una potente neutralización de la infección por el hMPV.

BREVE RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

En un aspecto, se proporciona un polipéptido F de prefusión antigénico del metapneumovirus humano (hMPV), o una molécula de ácido nucleico que codifica el mismo, en donde dicho polipéptido F de prefusión carece de un dominio transmembrana y de una cola citoplásmica, y comprende un sitio de escisión por proteasa del rinovirus humano 3C (RVH-3C).

En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende adicionalmente una mutación del sitio de escisión F0 que comprende las sustituciones de aminoácidos Q100R y S101R, que reemplazan la glutamina en la posición de aminoácido 100 de SEQ ID NO: 1 por arginina, y que reemplazan la serina en la posición de aminoácido 101 de SEQ ID NO: 1 por arginina.

En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende un péptido señal.

En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende al menos una secuencia etiqueta que es opcionalmente una etiqueta de polihistidina (p. ej., una etiqueta 6x His, una etiqueta 8x His, etc.) y/o una etiqueta Strep II.

En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende un dominio "foldón".

En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende una sustitución

de aminoácidos que reemplaza un aminoácido de tipo salvaje en la posición 160 de SEQ ID NO: 1, y una sustitución de aminoácidos que reemplaza un aminoácido de tipo salvaje en la posición 46 de SEQ ID NO: 1.

En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende una sustitución de aminoácidos que reemplaza la treonina en la posición de aminoácido 160 de SEQ ID NO: 1, y una sustitución de aminoácidos que reemplaza la asparragina en la posición de aminoácido 46 de SEQ ID NO: 1.

En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende una sustitución de aminoácidos que reemplaza el aminoácido en la posición 160 por fenilalanina, triptófano, tirosina, valina, alanina, isoleucina o leucina. En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende una sustitución de aminoácidos que reemplaza el aminoácido en la posición 160 por fenilalanina.

En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende una sustitución de aminoácidos que reemplaza el aminoácido en la posición 46 por valina, alanina, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina o prolina. En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende una sustitución de aminoácidos que reemplaza el aminoácido en la posición 46 por valina.

En ciertas realizaciones ilustrativas, el hMPV es una cepa A o una cepa B. En ciertas realizaciones ilustrativas, el hMPV es del subtipo A1, del subtipo A2, del subtipo B1 o del subtipo B2.

En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 o comprende SEQ ID NO: 3.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un ARN mensajero (ARNm) que comprende un marco de lectura abierto (ORF) que codifica el polipéptido F.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto, opcionalmente por vía intramuscular, intranasal, intravenosa, subcutánea o intradérmica, una cantidad profilácticamente eficaz del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm o una cantidad profilácticamente eficaz de la vacuna.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un método de prevención de una infección por hMPV o de reducción de uno o más síntomas de una infección por hMPV, que comprende la administración al sujeto, opcionalmente por vía intramuscular, intranasal, intravenosa, subcutánea o intradérmica, de una cantidad profilácticamente eficaz del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm o una cantidad profilácticamente eficaz de la vacuna.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporcionan un uso del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm, o la vacuna, para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesite.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporcionan el polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm, o la vacuna, para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesite.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un kit que comprende un recipiente con una dosis de un solo uso o de varios usos del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm o la vacuna, opcionalmente en donde el recipiente es un vial o una jeringa precargada o un inyector.

5 En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un vector de expresión que codifica el polipéptido F, la molécula de ácido nucleico o el ARNm.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona una célula que comprende el vector de expresión.

10 En otro aspecto, se proporcionan un polipéptido F de prefusión antigénico de metapneumovirus humano (hMPV), o una molécula de ácido nucleico que codifica el mismo, en donde dicho polipéptido F de prefusión carece de un dominio transmembrana y carece de una cola citoplásmica, y comprende: una mutación en el sitio de escisión F₀ que comprende las sustituciones de aminoácidos Q100R y S101R; el remplazo de la glutamina en la posición de aminoácido 100 de SEQ ID NO: 1 por arginina, y la sustitución de la serina en la posición de aminoácido 101 de SEQ ID NO: 1 por arginina; un sitio de escisión por
15 proteasa del rinovirus humano 3C (RVH-3C); un péptido señal heterólogo; una etiqueta de polihistidina (p. ej., una etiqueta 6x His, una etiqueta 8x His, etc.) y/o una etiqueta Strep II; y un dominio foldón.

En otro aspecto, se proporcionan un polipéptido F antigénico del metapneumovirus de prefusión humano (hMPV), o una molécula de ácido nucleico que codifica el mismo, en donde dicho polipéptido F de prefusión carece de un dominio transmembrana y carece de una cola citoplásmica, y comprende una
20 sustitución de aminoácidos que reemplaza la treonina en la posición de aminoácido 160 de SEQ ID NO: 1, y una sustitución de aminoácidos que reemplaza a la asparragina en la posición de aminoácido 46 de SEQ ID NO: 1.

En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende una sustitución de aminoácidos que reemplaza la treonina en la posición de aminoácido 160 por fenilalanina, triptófano o
25 tirosina. En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende una sustitución de aminoácidos T160F que reemplaza la treonina en la posición de aminoácido 160 con fenilalanina.

En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende una sustitución de aminoácidos que reemplaza la asparragina en la posición de aminoácido 46 por valina, alanina, glicina, isoleucina, leucina o prolina. En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión
30 comprende una sustitución de aminoácidos N46V que reemplaza la asparragina en la posición de aminoácido 46 por valina.

En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 7.

En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende adicionalmente
35 una mutación del sitio de escisión F₀ que comprende las sustituciones de aminoácidos Q100R y S101R, que reemplazan la glutamina en la posición de aminoácido 100 de SEQ ID NO: 1 por arginina, y que reemplazan la serina en la posición de aminoácido 101 de SEQ ID NO: 1 por arginina.

En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende un péptido señal.

En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende al menos una secuencia etiqueta que es opcionalmente una etiqueta de polihistidina (p. ej., una etiqueta 6x His, una etiqueta 8x His, etc.) y/o una etiqueta Strep II.

5 En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende un dominio foldón.

En ciertas realizaciones ilustrativas, el hMPV es una cepa A o una cepa B. En ciertas realizaciones ilustrativas, el hMPV es del subtipo A1, del subtipo A2, del subtipo B1 o del subtipo B2.

En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 o comprende SEQ ID NO: 3.

10 En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un ARN mensajero (ARNm) que comprende un marco de lectura abierto (ORF) que codifica el polipéptido F.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto, opcionalmente por vía intramuscular, intranasal, intravenosa, subcutánea o intradérmica, una cantidad profilácticamente eficaz
15 del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm o una cantidad profilácticamente eficaz de la vacuna.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un método de prevención de una infección por hMPV o de reducción de uno o más síntomas de una infección por hMPV, que comprende la administración al sujeto, opcionalmente por vía intramuscular, intranasal, intravenosa, subcutánea o
20 intradérmica, de una cantidad profilácticamente eficaz del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm o una cantidad profilácticamente eficaz de la vacuna.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un uso del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm, o la vacuna, para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesite.

25 En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporcionan el polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm, o la vacuna, para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesite.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un kit que comprende un recipiente con una dosis de un solo uso o de varios usos del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad
30 profilácticamente eficaz del ARNm o la vacuna, opcionalmente en donde el recipiente es un vial o una jeringa precargada o un inyector.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un vector de expresión que codifica el polipéptido F, la molécula de ácido nucleico o el ARNm.

35 En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona una célula que comprende el vector de expresión.

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido F de prefusión antigénico del metapneumovirus humano (hMPV), o una molécula de ácido nucleico que codifica el mismo, en donde dicho polipéptido F de prefusión carece de un dominio transmembrana y carece de una cola citoplásmica, y comprende: una

sustitución de aminoácidos T160F que reemplaza la treonina en la posición de aminoácido 160 de SEQ ID NO: 1 por fenilalanina, y una sustitución de aminoácidos N46V que reemplaza la asparragina en la posición de aminoácido 46 de SEQ ID NO: 1 por valina; una mutación del sitio de escisión F₀ que comprende las sustituciones de aminoácidos Q100R y S101R; que reemplaza la glutamina en la posición de aminoácido 100 de SEQ ID NO: 1 por arginina, y que reemplaza la serina en la posición de aminoácido 101 de SEQ ID NO: 1 por arginina; un sitio de escisión por proteasa del rinovirus humano 3C (RVH-3C); un péptido señal; una etiqueta de polihistidina (p. ej., una etiqueta 6x His, una etiqueta 8x His, etc.) y/o una etiqueta Strep II; y un dominio foldón.

En ciertas realizaciones ilustrativas, el hMPV es una cepa A o una cepa B. En ciertas realizaciones ilustrativas, el hMPV es del subtipo A1, del subtipo A2, del subtipo B1 o del subtipo B2.

En ciertas realizaciones ilustrativas, dicho polipéptido F de prefusión comprende al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3 o comprende SEQ ID NO: 3.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un ARN mensajero (ARNm) que comprende un marco de lectura abierto (ORF) que codifica el polipéptido F.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto, opcionalmente por vía intramuscular, intranasal, intravenosa, subcutánea o intradérmica, una cantidad profilácticamente eficaz del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm o una cantidad profilácticamente eficaz de la vacuna.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un método de prevención de una infección por hMPV o de reducción de uno o más síntomas de una infección por hMPV, que comprende la administración al sujeto, opcionalmente por vía intramuscular, intranasal, intravenosa, subcutánea o intradérmica, de una cantidad profilácticamente eficaz del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm o una cantidad profilácticamente eficaz de la vacuna.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un uso del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm, o la vacuna, para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesite.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporcionan el polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm, o la vacuna, para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesite

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un kit que comprende un recipiente con una dosis de un solo uso o de varios usos del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm o la vacuna, opcionalmente en donde el recipiente es un vial o una jeringa precargada o un inyector.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un vector de expresión que codifica el polipéptido F, la molécula de ácido nucleico o el ARNm.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona una célula que comprende el vector de expresión.

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido F del metapneumovirus humano (hMPV), o una molécula de ácido nucleico que codifica el mismo, en donde dicho polipéptido F comprende al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 7.

En ciertas realizaciones ilustrativas, el polipéptido F es un polipéptido F de prefusión.

5 En ciertas realizaciones ilustrativas, el polipéptido F es antigénico.

En ciertas realizaciones ilustrativas, el polipéptido F comprende la sustitución de aminoácidos T160F que reemplaza la treonina en la posición de aminoácido 160 por fenilalanina, y la sustitución de aminoácidos N46V que reemplaza la asparragina en la posición de aminoácido 46 por valina.

En ciertas realizaciones ilustrativas, el polipéptido F comprende SEQ ID NO: 7.

10 En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica cualquiera de los polipéptidos del aspecto anterior o de cualquiera de las realizaciones anteriores. En ciertas realizaciones ilustrativas, la molécula de ácido nucleico tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 8. En ciertas realizaciones ilustrativas, la molécula de ácido nucleico comprende SEQ ID NO: 8. En ciertas realizaciones ilustrativas, la molécula de ácido nucleico tiene al
15 menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 18. En ciertas realizaciones ilustrativas, la molécula de ácido nucleico comprende SEQ ID NO: 18. En ciertas realizaciones ilustrativas, la molécula de ácido nucleico tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 19. En ciertas realizaciones ilustrativas, la molécula de ácido nucleico comprende SEQ ID NO: 19.

20 En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los polipéptidos de las realizaciones anteriores, o cualquiera de las moléculas de ácido nucleico que codifican los mismos. En ciertas realizaciones ilustrativas, la composición farmacéutica es una vacuna.

25 En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria al hMPV o para proteger a un sujeto contra la infección por hMPV, que comprende la administración de la vacuna a un sujeto.

En ciertas realizaciones ilustrativas, el sujeto tiene una concentración sérica comparable de anticuerpos neutralizantes contra el hMPV tras la administración de la vacuna, con relación a un sujeto al que se le administra una vacuna proteica contra el hMPV. En ciertas realizaciones ilustrativas, la vacuna proteica contra el hMPV se coadministra con un adyuvante.

30 En ciertas realizaciones ilustrativas, la vacuna aumenta la concentración sérica de anticuerpos neutralizantes en un sujeto con inmunidad preexistente al hMPV.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona una vacuna para su uso en la obtención de una respuesta inmunitaria al hMPV o la protección de un sujeto contra la infección por hMPV, que comprende la administración de la vacuna a un sujeto.

35 En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona el uso de la vacuna en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria al hMPV o para proteger a un sujeto contra la infección por hMPV.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un ARN mensajero (ARNm) que comprende

un marco de lectura abierto (ORF) que codifica el polipéptido F.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto, opcionalmente por vía intramuscular, intranasal, intravenosa, subcutánea o intradérmica, una cantidad profilácticamente eficaz del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm o una cantidad profilácticamente eficaz de la vacuna.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un método de prevención de una infección por hMPV o de reducción de uno o más síntomas de una infección por hMPV, que comprende la administración al sujeto, opcionalmente por vía intramuscular, intranasal, intravenosa, subcutánea o intradérmica, de una cantidad profilácticamente eficaz del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm o una cantidad profilácticamente eficaz de la vacuna.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un uso del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm, o la vacuna, para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesite.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporcionan el polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm, o la vacuna, para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesite

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un kit que comprende un recipiente con una dosis de un solo uso o de varios usos del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm o la vacuna, opcionalmente en donde el recipiente es un vial o una jeringa precargada o un inyector.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un vector de expresión que codifica el polipéptido F, la molécula de ácido nucleico o el ARNm.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona una célula que comprende el vector de expresión.

En otro aspecto, se proporciona un ARN mensajero (ARNm) que comprende un marco de lectura abierto (ORF) que codifica un antígeno del polipéptido F del metapneumovirus humano (hMPV), en donde el antígeno del polipéptido F de hMPV comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 11 o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

En ciertas realizaciones ilustrativas, el antígeno del polipéptido F de hMPV es un polipéptido F de pre-fusión.

En ciertas realizaciones ilustrativas, el ORF tiene codones optimizados.

En ciertas realizaciones ilustrativas, el ARNm comprende al menos una región no traducida 5' (UTR 5'), al menos una región no traducida 3' (3' UTR), y al menos una secuencia de poliadenilación (poli(A)).

En ciertas realizaciones ilustrativas, el ARNm comprende al menos una modificación química.

En ciertas realizaciones ilustrativas, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o 100% de

los nucleótidos de uracilo en el ARNm están modificados químicamente.

En ciertas realizaciones ilustrativas, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o 100% de los nucleótidos de uracilo en el ORF están modificados químicamente.

5 En ciertas realizaciones ilustrativas, la modificación química se selecciona del grupo que consiste en pseudouridina, N1-metilpseudouridina, 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitosina, 2-tio-l-metil-1-desaza-pseudouridina, 2-tio-l-metil-pseudouridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-pseudouridina, 4-tio-l-metil-pseudouridina, 4-tio-pseudouridina, 5-aza-uridina, dihidropseudouridina, 5-metiluridina, 5-metiluridina, 5-
10 metoxiuridina y 2'-O-metil uridina. En ciertas realizaciones ilustrativas, la modificación química se selecciona del grupo que consiste en pseudouridina, N1-metilpseudouridina, 5-metilcitosina, 5-metoxiuridina y una combinación de las mismas. En ciertas realizaciones ilustrativas, la modificación química es N1-metilpseudouridina.

En ciertas realizaciones ilustrativas, el ARNm se formula en una nanopartícula lipídica (NPL).

15 En ciertas realizaciones ilustrativas, la NPL comprende al menos un lípido catiónico. En ciertas realizaciones ilustrativas, el lípido catiónico es biodegradable. En ciertas realizaciones ilustrativas, el lípido catiónico no es biodegradable. En ciertas realizaciones ilustrativas, el lípido catiónico es escindible. En ciertas realizaciones ilustrativas, el lípido catiónico no es escindible.

En ciertas realizaciones ilustrativas, el lípido catiónico se selecciona del grupo que consiste en
20 OF-02, cKK-E10, GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1, GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, y GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14. En ciertas realizaciones ilustrativas, el lípido catiónico es cKK-E10. En ciertas realizaciones ilustrativas, el lípido catiónico es GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10.

En ciertas realizaciones ilustrativas, la NPL comprende adicionalmente un lípido conjugado con polietilenglicol (PEG) (PEGilado), un lípido basado en colesterol y un lípido auxiliar.

25 En ciertas realizaciones ilustrativas, la NPL comprende: un lípido catiónico a una razón molar de 35% a 55%; un lípido conjugado con polietilenglicol (PEG) (PEGilado) a una razón molar de 0.25% a 2.75%, un lípido basado en colesterol a una razón molar de 20% a 45%, y un lípido auxiliar a una razón molar de 5% a 35%, en donde todas las razones molares son relativas al contenido total de lípidos de la NPL.

30 En ciertas realizaciones ilustrativas, la NPL comprende: un lípido catiónico a una razón molar de 40%, un lípido PEGilado a una razón molar de 1.5%, un lípido basado en colesterol a una razón molar de 28.5%, y un lípido auxiliar a una razón molar de 30%.

En ciertas realizaciones ilustrativas, el lípido PEGilado es dimiristoil-PEG2000 (DMG-PEG2000) o 2-[(polietilenglicol)-2000]-N,N-ditetradecilacetamida (ALC-0159).

35 En ciertas realizaciones ilustrativas, el lípido basado en colesterol es colesterol.

En ciertas realizaciones ilustrativas, el lípido auxiliar es 1,2-dioleoil-SN-glicero-3-fosfolina (DOPE) o 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC).

En ciertas realizaciones ilustrativas, la NPL comprende: GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 a una

razón molar de 40%, DMG-PEG2000 a una razón molar de 1.5%, colesterol a una razón molar de 28.5% y DOPE a una razón molar de 30%.

En ciertas realizaciones ilustrativas, la NPL comprende: cKK-E10 a una razón molar de 40%, DMG-PEG2000 a una razón molar de 1.5%, colesterol a una razón molar de 28.5% y DOPE a una razón molar de 30%.

En ciertas realizaciones ilustrativas, la NPL tiene un diámetro medio de 30 nm a 200 nm. En ciertas realizaciones ilustrativas, la NPL tiene un diámetro medio de 80 nm a 150 nm.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el ARNm. En ciertas realizaciones ilustrativas, la composición farmacéutica comprende una vacuna.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria al hMPV o para proteger a un sujeto contra la infección por hMPV, que comprende la administración de la vacuna a un sujeto.

En ciertas realizaciones ilustrativas, el sujeto tiene una concentración sérica comparable de anticuerpos neutralizantes contra el hMPV tras la administración de la vacuna, con relación a un sujeto al que se le administra una vacuna proteica contra el hMPV. En ciertas realizaciones ilustrativas, la vacuna proteica contra el hMPV se coadministra con un adyuvante.

En ciertas realizaciones ilustrativas, la vacuna aumenta la concentración sérica de anticuerpos neutralizantes en un sujeto con inmunidad preexistente al hMPV.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona una vacuna para su uso en la obtención de una respuesta inmunitaria al hMPV o la protección de un sujeto contra la infección por hMPV, que comprende la administración de la vacuna a un sujeto.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona el uso de la vacuna en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria al hMPV o para proteger a un sujeto contra la infección por hMPV.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto, opcionalmente por vía intramuscular, intranasal, intravenosa, subcutánea o intradérmica, una cantidad profilácticamente eficaz del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm o una cantidad profilácticamente eficaz de la vacuna.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un método de prevención de una infección por hMPV o de reducción de uno o más síntomas de una infección por hMPV, que comprende la administración al sujeto, opcionalmente por vía intramuscular, intranasal, intravenosa, subcutánea o intradérmica, de una cantidad profilácticamente eficaz del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm o una cantidad profilácticamente eficaz de la vacuna.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un uso del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm, o la vacuna, para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesite.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporcionan el polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm, o la vacuna, para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesite.

5 En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un kit que comprende un recipiente con una dosis de un solo uso o de varios usos del polipéptido F o la molécula de ácido nucleico, una cantidad profilácticamente eficaz del ARNm o la vacuna, opcionalmente en donde el recipiente es un vial o una jeringa precargada o un inyector.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un vector de expresión que codifica el polipéptido F, la molécula de ácido nucleico o el ARNm.

10 En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona una célula que comprende el vector de expresión.

En otro aspecto, se proporciona una vacuna que comprende un antígeno del polipéptido F del metapneumovirus humano (hMPV) o una molécula de ácido nucleico que codifica el mismo, en donde el polipéptido F comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 7 o que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En ciertas realizaciones ilustrativas, el polipéptido F de hMPV es un polipéptido F de pre-fusión.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria al hMPV o para proteger a un sujeto contra la infección por hMPV, que comprende la administración de la vacuna a un sujeto.

20 En ciertas realizaciones ilustrativas, la vacuna se coadministra con un adyuvante. En ciertas realizaciones ilustrativas, la vacuna se administra combinada con una vacuna adicional. En ciertas realizaciones ilustrativas, la vacuna adicional es una vacuna contra el virus respiratorio sincitial (VRS) o una vacuna contra la gripe.

En ciertas realizaciones ilustrativas, el sujeto es humano. En ciertas realizaciones ilustrativas, el sujeto humano es un lactante, un niño pequeño o un adulto mayor.

En ciertas realizaciones ilustrativas, la vacuna aumenta la concentración sérica de anticuerpos neutralizantes, y en donde el sujeto tiene inmunidad preexistente al hMPV.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona una vacuna para su uso en la obtención de una respuesta inmunitaria al hMPV o la protección de un sujeto contra la infección por hMPV, que comprende la administración de la vacuna a un sujeto.

30 En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un uso de la vacuna en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria al hMPV o para proteger a un sujeto contra la infección por hMPV.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto, opcionalmente por vía intramuscular, intranasal, intravenosa, subcutánea o intradérmica, una cantidad profilácticamente eficaz de la vacuna.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un método de prevención de una infección

por hMPV o de reducción de uno o más síntomas de una infección por hMPV, que comprende la administración al sujeto, opcionalmente por vía intramuscular, intranasal, intravenosa, subcutánea o intradérmica, de una cantidad profilácticamente eficaz de la vacuna.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un uso de la vacuna para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesite.

En ciertas realizaciones ilustrativas, la vacuna se proporciona para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesite.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un kit que comprende un recipiente con una dosis de un solo uso o de varios usos de la vacuna, opcionalmente en donde el recipiente es un vial o una jeringa precargada o un inyector.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona un vector de expresión que codifica el polipéptido F, la molécula de ácido nucleico o el ARNm.

En ciertas realizaciones ilustrativas, se proporciona una célula que comprende el vector de expresión.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

Lo anterior y otras características y ventajas de la presente divulgación se entenderán mejor a partir de la siguiente descripción detallada de las realizaciones ilustrativas tomadas en conjunto con los dibujos adjuntos. Este expediente de patente o de solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. La Oficina proporcionará copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con uno o varios dibujos en color previa solicitud y pago de la tasa correspondiente.

La **FIG. 1** representa las consideraciones de diseño para el panel de 21 antígenos F de prefusión de hMPV candidatos mostrados como dos construcciones ilustrativas, D185P y T160_N46V. La construcción D185P se utiliza como referencia para medir las actividades de varias construcciones novedosas. "(mut)" = secuencias de aminoácidos "ENPRRRR" sombreadas y aminoácidos singulares "P" sombreado, "V" sombreado y "F" sombreado; "conector" = secuencias de aminoácidos "GGGGS", "GRS" y "G" subrayadas y en negrita; "foldón" = secuencias de aminoácidos "GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL" subrayadas; "8xHIS" = secuencias de aminoácidos "HHHHHHHH" sombreadas; "StrepII" = secuencias "SAWSHPQFEK" sombreadas.

La **FIG. 2** representa el título de anticuerpos IgG de ratón contra cuatro de las construcciones de proteína de antígeno F de prefusión del hMPV medido en el día 0, 21 y 35 (puntos de datos enumerados en orden de izquierda a derecha en cada punto de tiempo como sigue) : (1) A2-F D185P, (2) A2-F T160F_N46V, (3) A2-F K138F, y (4) A2-F G366F_K362F, así como los controles: hMPV (5) A1-F pre-F lote 1, (6) A1-F pre-F lote 2, (7) A1-F post F, y (8) B2 pre-F.

La **FIG. 3** representa el título de anticuerpos de microneutralización del hMPV de ratón medido en el día 21 y 35 contra cuatro de las construcciones de proteína de antígeno F de prefusión del hMPV: (1) A2-F D185P, (2) A2-F T160F_N46V, (3) A2-F K138F, y (4) A2-F G366F_K362F, así como los controles: hMPV (5) A1 pre-F lote 1, (6) A1 pre-F lote 2, (7) A1 post F, y (8) B2 pre-F.

La **FIG. 4** representa los resultados de SEC-MALS para las proteínas A1 de referencia, A1-A185P

y A1-postF y los candidatos a antígeno proteico A2, A2-T160F_N46V y A2-D185P.

La **FIG. 5** representa las curvas de fusión representativas [a la emisión de fluorescencia de 330 y 350 nm] (panel superior), la curva suavizada de la primera derivada (panel central) y la dispersión de la luz [mUA] (panel inferior) para A1-pre-F así como para A1-post-F según las mediciones de nanoDSF.

5 La **FIG. 6** representa una curva de fusión representativa [a la emisión de fluorescencia de 330 y 350 nm] (panel superior) y la curva suavizada de la primera derivada (panel central), así como la dispersión de la luz [mUA] (panel inferior) para las muestras de proteína obtenidas a partir de las construcciones A2-D185P y A2-T160F_N46V, según las mediciones de nanoDSF.

10 La **FIG. 7** representa el título de anticuerpos IgG del antígeno F de hMPV de ratón tras la administración de cualquiera de las construcciones de ARNm de F de prefusión del hMPV, A2-D185P o A2-T160F_N46V, formuladas con NPL medido en el día 0, 21 y 35.

La **FIG. 8** representa el título de anticuerpos de microneutralización del hMPV de ratón tras la administración de cualquiera de las construcciones de ARNm de F de prefusión del hMPV, A2-D185P o A2-T160F_N46V, formuladas con NPL y medido en los días 0, 21 y 35.

15 La **FIG. 9** representa los títulos de anticuerpos anti-F de VRS en ratones vacunados con (1) ARNm de F de VRS; (2) ARNm de F de VRS más F de hMPV; o (3) proteína de VRS, medidos mediante ELISA de punto final utilizando una proteína pre-F de VRS como antígeno de unión y detectados con anti-IgG de ratón de conejo. Las lecturas de animales individuales (n=8) se muestran para el punto de tiempo D35 como títulos de la transformada en log2 con media +/- intervalo de confianza de 95%.

20 La **FIG. 10** representa los títulos de anticuerpos anti-F de hMPV en ratones vacunados con (1) ARNm de F de hMPV; (2) ARNm de F de VRS más F de hMPV; o (3) proteína de hMPV, medidos mediante ELISA de punto final utilizando una proteína pre-F de hMPV como antígeno de unión y detectados con anti-IgG de ratón de cabra. Las lecturas de animales individuales (n=8) se muestran para el punto de tiempo D35 como títulos de la transformada en log2 con media +/- intervalo de confianza de 95%.

25 La **FIG. 11** representa los títulos de anticuerpos neutralizantes de VRS en ratones vacunados con (1) ARNm de F de VRS; (2) ARNm de F de VRS más F de hMPV; o (3) proteína de VRS, medidos mediante un ensayo de microneutralización utilizando la cepa A2-GFP de VRS mezclada con sueros diluidos en serie de ratones vacunados en placas de 96 pocillos de células Vero. Los títulos se determinaron calculando la reducción inversa de los focos fluorescentes tras una incubación de 24 horas. Las lecturas de animales individuales (n=8) se muestran para el punto de tiempo D35 como títulos de la transformada en log2 con media +/- intervalo de confianza de 95%.

30 La **FIG. 12** representa los títulos de anticuerpos neutralizantes de hMPV en ratones vacunados con (1) ARNm de F de hMPV; (2) ARN de F de VRS más F de hMPV; o (3) proteína de hMPV, medidos mediante un ensayo de microneutralización utilizando la cepa A2-GFP de hMPV mezclada con sueros diluidos en serie de ratones vacunados en placas de 96 pocillos de células Vero. Los títulos se determinaron calculando la reducción inversa de los focos fluorescentes tras una incubación de 24 horas. Las lecturas de animales individuales (n=8) se muestran para el punto de tiempo D35 como títulos de la

transformada en log2 con media +/- intervalo de confianza de 95%.

La **FIG. 13** muestra una inmunotransferencia de los niveles de expresión de la proteína F de hMPV para D185P y T160_N46V utilizando 0.3 millones de células/pocillo transfectadas con 1 µg de ARNm.

5 La **FIG. 14** representa la expresión del epítipo en las células transfectadas con F de HMPV de tipo salvaje, D185P o T160F_N46V utilizando el anticuerpo pre-F (panel A), el anticuerpo post-F (panel B) o un anticuerpo pre-F/post-F (panel C). La línea superior corresponde a T160F_N46V de hMPV MNR, la línea central corresponde a CAN97-83 de hMPV MNR, y la línea inferior corresponde a D185P de hMPV MNR en cada uno de los paneles A, B y C.

10 La **FIG. 15** representa el montaje MIMIC del hMPV para evaluar la inmunogenicidad de dos candidatos a hMPV en 24 donantes.

La **FIG. 16** representa el título de anticuerpos IgG humanos medido en el día 14 recogidos del sobrenadante de los cocultivos MIMIC tratados con IPOL (una vacuna contra la polio) a una dilución de 1:50 o un control no tratado (sin tratamiento y sin células de músculo esquelético humano en cocultivo, "sin antígeno (sin HSK)") contra tres cepas de polio - Polio 1 (panel A), Polio 2 (panel B) y Polio 3 (panel C).

La **FIG. 17** representa el título de anticuerpos IgG humanos medido en el día 14 recogidos del sobrenadante de los cocultivos MIMIC tratados con 50 ng/ml de NP pre-F de VRS (proteína pre-F de VRS fusionada a nanopartículas de ferritina) para pre-F de VRS (panel A) y post-F de VRS (panel C). El panel C representa si los anticuerpos son funcionales, medidos en un ensayo de neutralización del VRS.

La **FIG. 18** representa gráficamente las respuestas de anticuerpos pre-F (panel A) y post-F (panel B). N = 22; los datos se presentan en Media Geo con I.C. de 95%.

La **FIG. 19** representa gráficamente los títulos de anticuerpos neutralizantes pre-F y post-F. N = 22; los datos se presentan en Media Geo con I.C. de 95%.

25 La **FIG. 20** representa el título de anticuerpos IgG humanos medido en el día 14 recogidos del sobrenadante de los cocultivos MIMIC tratados con grupos experimentales - proteína pre-F de hMPV (a 100 ng/ml o 500 ng/ml) o proteína de antígeno post-F de hMPV (100 ng/ml) o grupos de control - sin antígeno sin HSK, NP pre-F de VRS, o IPOL para pre-F de hMPV (panel A) o antígeno post-F de hMPV (panel B).

30 La **FIG. 21** representa un título de anticuerpos de microneutralización del hMPV medido en el día 14 utilizando el sobrenadante recogido de los cocultivos MIMIC tratados con la proteína pre-F de hMPV (a 100 ng/ml o 500 ng/ml), proteína de antígeno post-F de hMPV (100 ng/ml), o sin antígeno sin HSK.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DIVULGACIÓN

La presente divulgación se dirige, *entre otras cosas*, a polipéptidos F de prefusión antigénicos de hMPV, secuencias de ácido nucleico (p. ej., secuencias de ARN, p. ej., secuencias de ARNm) que codifican polipéptidos F de prefusión antigénicos de hMPV, composiciones que comprenden polipéptidos F de prefusión antigénicos de hMPV, composiciones que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos F de prefusión antigénicos de hMPV, y vacunas contra el hMPV.

I. Definiciones

A menos que se defina de otro modo en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados con relación a la presente invención tendrán el significado que comúnmente entienden los expertos en la técnica. A continuación se describen métodos y materiales ilustrativos, aunque también pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o en las pruebas de la presente invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones. En general, la nomenclatura utilizada con relación a, y las técnicas de cultivo de células y tejidos, biología molecular, virología, inmunología, microbiología, genética, química analítica, química orgánica sintética, química médica y farmacéutica, química de proteínas y ácidos nucleicos, e hibridación descritas en el presente documento son las bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se realiza habitualmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Adicionalmente, a menos que el contexto exija lo contrario, los términos singulares incluirán los plurales y los plurales incluirán los singulares. A lo largo de esta memoria descriptiva y de las realizaciones, se entenderán que las palabras "tener" y "comprender", o variaciones tales como "tiene", "que tiene", "comprende" o "que comprende", implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros. Todas las publicaciones y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan como referencia en su totalidad. Aunque se citan varios documentos en el presente documento, esta cita no constituye una admisión de que cualquiera de estos documentos forma parte del conocimiento general común en la técnica.

Cabe señalar que el término "una" entidad se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que "una secuencia de nucleótidos", representa una o más secuencias de nucleótidos. Como tales, los términos "un" (o "una"), "uno o más" (o "una o más") y "al menos uno" (o "al menos una") pueden utilizarse indistintamente en el presente documento.

Además, "y/o", cuando se utiliza en el presente documento, debe entenderse como la divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados, con o sin el otro. Por lo tanto, se pretende que el término "y/o" utilizado en una frase tal como "A y/o B" en el presente documento incluya "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B" (solo). Asimismo, se pretende que el término "y/o" utilizado en una frase tal como "A, B, y/o C" abarque cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

Se entiende que siempre que se describan aspectos en el presente documento con el lenguaje "que comprende", también se proporcionan aspectos análogos descritos en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona con conocimientos normales en la técnica con la que se relaciona esta divulgación. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2ª ed., 2002, CRC Press; The Dictionary

of Cell and Molecular Biology, 3ª ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Revisado, 2000, Oxford University Press, pueden proporcionar a un experto un diccionario general de muchos de los términos utilizados en esta divulgación.

Las unidades, prefijos y símbolos se indican en su forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los rangos numéricos incluyen los números que definen el rango. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación amino-carboxi. Los epígrafes proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos de la divulgación. En consecuencia, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más completamente como referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

Los términos "de manera aproximada" o "aproximadamente" se utilizan en el presente documento para representar de manera aproximada, más o menos, o en las regiones de. Cuando el término "aproximadamente" se utiliza junto con un rango numérico, modifica dicho rango ampliando los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término "aproximadamente" puede modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor establecido en una variación de, p. ej., 10 por ciento, hacia arriba o hacia abajo (mayor o menor). En algunas realizaciones, el término indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0.9\%$, $\pm 0.8\%$, $\pm 0.7\%$, $\pm 0.6\%$, $\pm 0.5\%$, $\pm 0.4\%$, $\pm 0.3\%$, $\pm 0.2\%$, $\pm 0.1\%$, $\pm 0.05\%$ o $\pm 0.01\%$. En algunas realizaciones, "aproximadamente" indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 10\%$. En algunas realizaciones, "aproximadamente" indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 5\%$. En algunas realizaciones, "aproximadamente" indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 4\%$. En algunas realizaciones, "aproximadamente" indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 3\%$. En algunas realizaciones, "aproximadamente" indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 2\%$. En algunas realizaciones, "aproximadamente" indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 1\%$. En algunas realizaciones, "aproximadamente" indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 0.9\%$. En algunas realizaciones, "aproximadamente" indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 0.8\%$. En algunas realizaciones, "aproximadamente" indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 0.7\%$. En algunas realizaciones, "aproximadamente" indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 0.6\%$. En algunas realizaciones, "aproximadamente" indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 0.5\%$. En algunas realizaciones, "aproximadamente" indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 0.4\%$. En algunas realizaciones, "aproximadamente" indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 0.3\%$. En algunas realizaciones, "aproximadamente" indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 0.1\%$. En algunas realizaciones, "aproximadamente" indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 0.05\%$. En algunas realizaciones, "aproximadamente" indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 0.01\%$.

Como se emplean en el presente documento, los términos "ARN mensajero" o "ARNm" se refieren a un polinucleótido que codifica al menos un polipéptido. El ARNm, como se emplea en el presente documento, abarca tanto el ARN modificado como el no modificado. El ARNm puede contener una o más regiones codificantes y no codificantes. Una región codificante se denomina alternativamente

marco de lectura abierto (ORF). Las regiones no codificantes del ARNm incluyen la protección terminal 5', la región no traducida (UTR) 5', la UTR 3' y una cola de poli(A). El ARNm puede purificarse a partir de fuentes naturales, producirse mediante sistemas de expresión recombinante (p. ej., transcripción *in vitro*) y opcionalmente purificarse o sintetizarse químicamente.

5 Como se emplea en el presente documento, el término "sitio antigénico Ø" o "epítipo del sitio Ø" se refiere a un sitio situado en la forma de prefusión del trímero de F de hMPV. El epítipo del sitio Ø es un sitio de unión para los anticuerpos que tienen especificidad para F de hMPV de pre-fusión.

Como se emplea en el presente documento, el término "sitio antigénico V" o "epítipo del sitio V" se refiere a un sitio situado en la forma de prefusión del trímero de F de hMPV. El epítipo del sitio V es
10 un sitio de unión para los anticuerpos que tienen especificidad para F de hMPV de pre-fusión.

Como se emplea en el presente documento, el término "estabilidad del antígeno" se refiere a la estabilidad del antígeno a lo largo del tiempo o en solución.

Como se emplea en el presente documento, el término "sustituciones de relleno de cavidades" se refiere a sustituciones hidrófobas diseñadas para rellenar las cavidades presentes en el trímero de F de
15 hMPV de pre-fusión.

Como se emplea en el presente documento, los términos "proteína F" o "proteína F de hMPV" se refieren a la proteína del hMPV responsable de mediar la fusión de la envoltura viral y la membrana de la célula anfitriona durante la entrada viral. La proteína F puede mediar la fusión entre las células infectadas y las no infectadas para formar células multinucleadas o sincitios.

20 Como se emplean en el presente documento, los términos "polipéptido F de hMPV", "polipéptido F" o "antígeno del polipéptido F" se refieren a un polipéptido que comprende al menos un epítipo de la proteína F de hMPV.

Como se emplea en el presente documento, el término "dominio transmembrana" se refiere a una secuencia de aproximadamente 23 aminoácidos cerca del extremo c de F0/F1 de hMPV que atraviesa la
25 membrana del virión del hMPV. En ciertas realizaciones, un dominio transmembrana comprende la secuencia de aminoácidos GFIVIIILIAVLGSSMILVSIFII de SEQ ID NO: 1.

Como se emplea en el presente documento, el término "cola citoplásmica" se refiere a una secuencia de aproximadamente 25 aminoácidos en el extremo c-terminal del F de F0/F1 de hMPV que se encuentra dentro del virión. En ciertas realizaciones, un dominio transmembrana comprende la secuencia
30 de aminoácidos IKKTKKPTGAPPELSGVTNNGFIPHN de SEQ ID NO: 1.

Como se emplea en el presente documento, un "dominio foldón" se refiere a un dominio de trimerización de la fibritina T4.

Como se emplean en el presente documento, un "péptido señal" o "secuencia señal" se refieren a un péptido de aproximadamente 16-30 aminoácidos de longitud presente en el extremo amino terminal o
35 el extremo carboxi terminal de un polipéptido que funciona para translocar el polipéptido a la vía secretora en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. En ciertas realizaciones, una secuencia señal corresponde a los aminoácidos 1-18 de uno cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3, 5 y 7.

Como se emplean en el presente documento, una "secuencia etiqueta" o "etiqueta de afinidad" se

refieren a una secuencia polipeptídica que puede utilizarse para purificar un polipéptido o una proteína que comprenden la secuencia etiqueta. Las secuencias etiqueta incluyen, por ejemplo, etiquetas de polihistidina (p. ej., hexahistidina (etiqueta 6x His), octahistidina (etiqueta 8x His), etc.), glutatión S-transferasa (GST), FLAG, péptido de unión a estreptavidina (SBP), strep II, proteína de unión a maltosa (MBP), proteína de unión a calmodulina (CBP), dominio de unión a quitina (CBD), proteína S de ARNasa A, hemaglutinina (HA), c-Myc, y similares.

Como se emplea en el presente documento, el término "sustituciones estabilizadoras intraprotoméricas" se refiere a sustituciones de aminoácidos en F de hMPV que estabilizan la conformación de pre-fusión al estabilizar la interacción dentro de un protómero del trímero de F de hMPV.

Como se emplea en el presente documento, el término "sustituciones estabilizadoras interprotoméricas" se refiere a sustituciones de aminoácidos en F de hMPV que estabilizan la conformación de pre-fusión al estabilizar la interacción de los protómeros del trímero de F de hMPV entre sí.

Como se emplea en el presente documento, el término "escisión por proteasa" se refiere a la proteólisis (a veces también denominada "recorte") de residuos susceptibles (p. ej., lisina o arginina) en un sitio de escisión por proteasa de una secuencia polipeptídica. Los sitios de escisión por proteasa incluyen sitios de escisión por la proteasa viral tal como, p. ej., un sitio de escisión por proteasa F0 del hMPV, un sitio de escisión por proteasa F0 del virus respiratorio sincitial (VRS) y un sitio de escisión por proteasa del rinovirus humano 3C (RVH-3C).

Como se emplea en el presente documento, el término "post-fusión" con respecto a F de hMPV se refiere a una conformación estable de F de hMPV que se produce después de la fusión de las membranas de la célula viral y de la célula anfitriona.

Como se emplea en el presente documento, el término "pre-fusión" con respecto a F de hMPV se refiere a una conformación de F de hMPV que se adopta antes de la interacción virus-célula.

Como se emplea en el presente documento, el término "protómero" se refiere a una unidad estructural de una proteína oligomérica. En el caso de F de hMPV, una unidad individual del trímero de F de hMPV es un protómero.

Como se emplea en el presente documento, el término "respuesta inmunitaria" se refiere a una respuesta de una célula del sistema inmunitario, tal como una célula B, una célula T, una célula dendrítica, un macrófago o un polimorfonucleocito, a un estímulo tal como un antígeno o una vacuna. Una respuesta inmunitaria puede incluir cualquier célula del organismo que participe en una respuesta de defensa del anfitrión, incluyendo, por ejemplo, una célula epitelial que secrete un interferón o una citoquina. Una respuesta inmunitaria incluye, pero no se limita a, una respuesta inmunitaria innata y/o adaptativa.

Como se emplea en el presente documento, una "respuesta inmunitaria protectora" se refiere a una respuesta inmunitaria que protege a un sujeto de la infección (p. ej., previene la infección o evita el desarrollo de la enfermedad asociada a la infección). Los métodos para medir las respuestas inmunitarias incluyen la medición, por ejemplo, de la proliferación y/o la actividad de los linfocitos (tales como células

B o T), la secreción de citocinas o quimiocinas, la inflamación, la producción de anticuerpos, y similares.

Como se emplea en el presente documento, una "respuesta de anticuerpos" es una respuesta inmunitaria en la que se producen anticuerpos.

Como se emplea en el presente documento, un "antígeno" se refiere a un agente que provoca una respuesta inmunitaria, y/o un agente que se une a un receptor de células T (p. ej., cuando es presentado por una molécula del MHC) o a un anticuerpo (p. ej., producido por una célula B) cuando se expone o se administra a un organismo. En algunas realizaciones, un antígeno provoca una respuesta humoral (p. ej., incluyendo la producción de anticuerpos específicos del antígeno) en un organismo. Alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, un antígeno provoca una respuesta celular (p. ej., con la participación de células T cuyos receptores interactúan específicamente con el antígeno) en un organismo. Un antígeno particular puede provocar una respuesta inmunitaria en uno o varios miembros de un organismo diana (p. ej., ratones, conejos, primates, seres humanos), pero no en todos los miembros de la especie del organismo diana. En algunas realizaciones, un antígeno provoca una respuesta inmunitaria en al menos aproximadamente 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de los miembros de una especie del organismo diana. En algunas realizaciones, un antígeno se une a un anticuerpo y/o a un receptor de células T y puede o no inducir una respuesta fisiológica particular en un organismo. En algunas realizaciones, por ejemplo, un antígeno puede unirse a un anticuerpo y/o a un receptor de células T *in vitro*, independientemente de que tal interacción se produzca o no *in vivo*. En algunas realizaciones, un antígeno reacciona con los productos de la inmunidad humoral o celular específica. Los antígenos incluyen los polipéptidos del hMPV descritos en el presente documento.

Como se emplea en el presente documento, un "adyuvante" se refiere a una sustancia o vehículo que mejora la respuesta inmunitaria a un antígeno. Los adyuvantes pueden incluir, sin limitación, una suspensión de minerales (p. ej., alumbre, hidróxido de aluminio o fosfato) sobre la que se adsorbe el antígeno; una emulsión de agua en aceite o aceite en agua en la que la solución de antígeno se emulsiona en aceite mineral o en agua (p. ej., adyuvante incompleto de Freund). A veces, se incluyen micobacterias muertas (p. ej., adyuvante completo de Freund) para aumentar aún más la antigenicidad. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores (p. ej., un motivo CpG) también pueden utilizarse como adyuvantes (p. ej., véanse las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116; 6.339.068; 6.406.705; y 6.429.199). Los adyuvantes también pueden incluir moléculas biológicas, tales como agonistas de Receptores Tipo Toll (TLR) y moléculas coestimuladoras.

Como se emplea en el presente documento, un "polipéptido antigénico del hMPV" se refiere a un polipéptido que comprende toda o parte de una secuencia de aminoácidos del hMPV de longitud suficiente para que la molécula sea antigénica con respecto al hMPV.

Como se emplea en el presente documento, un "sujeto" se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunas realizaciones, "sujeto" se refiere a seres humanos. En algunas realizaciones, "sujeto" se refiere a animales no humanos. En algunas realizaciones, los sujetos incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, insectos y/o gusanos. En ciertas realizaciones, el sujeto no

humano es un mamífero (p. ej., un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, ganado vacuno, un primate y/o un cerdo). En algunas realizaciones, un sujeto puede ser un animal transgénico, un animal modificado genéticamente y/o un clon. En algunas realizaciones, se utilizan los términos "individuo" o "paciente" y se pretende que sean intercambiables con "sujeto".

5 En algunas realizaciones, un "sujeto" se selecciona del grupo que consiste en: un sujeto de 65 años o más, un sujeto de 18 a 64 años (18 a <65 años), un sujeto de 12 años o más, un sujeto de 12 a 17 años (12 a <18 años), un sujeto de 6 a 11 años (6 a <12 años), un sujeto de 2 a 5 años (2 a <6 años), un sujeto de 1 a 4 años (1 a <5 años), un sujeto de 2 meses a un año (2 meses a < 2 años) y un sujeto de 0 a 2 meses (0 a <3 meses).

10 En algunas realizaciones, un "sujeto" se selecciona del grupo que consiste en: un adulto mayor (p. ej., un adulto mayor o anciano), un adulto, un adolescente, un niño, un niño pequeño y un lactante. En algunas realizaciones, un "sujeto" se selecciona del grupo que consiste en: un adulto mayor de 60 años o más, un anciano (p. ej., de 65 años o más), un adulto (p. ej., de 18 a 50 años o de 18 a 64 años), un adolescente de 12 a 17 años (p. ej., de 12 a <18 años), un niño de 6 a 11 años (p. ej., 6 a <12 años), un
15 niño de 2 a 5 años (p. ej., 2 a <6 años), un niño pequeño de 1 a 4 años (p. ej., 1 a < 5 años), un lactante de 2 meses a 1 año (p. ej., 2 meses a <2 años), un recién nacido (p. ej., de 0 a 27 días de edad) y un recién nacido prematuro (p. ej., con una edad gestacional inferior a 37 semanas). En algunas realizaciones, un sujeto se encuentra en un grupo de edad pediátrica según la definición de la FDA de EE.UU.: neonato (p. ej., desde el nacimiento hasta menos de un mes ("NEO")); lactante (p. ej., de 1 mes a
20 menos de 2 años ("INF")); niño (p. ej., de 2 años a menos de 12 años ("CHI")); y adolescente (p. ej., de 12 a menos de 17 años ("ADO")). En algunas realizaciones, un sujeto es un adulto mayor en un grupo de edad definido por la FDA de EE.UU. como de 65 años o más o de 75 años o más. En realizaciones particularmente ilustrativas, un sujeto es un lactante (p. ej., de 1 mes a menos de 2 años de edad), un niño pequeño (p. ej., de 1 a < 5 años de edad), o un adulto mayor (p. ej., de 60 años o más, 65 años o
25 más, o 75 años o más).

Como se emplean en el presente documento, los términos "vacunación" o "vacunar" se refieren a la administración de una composición destinada a generar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, frente a un agente causante de una enfermedad. La vacunación puede administrarse antes, durante y/o después de la exposición a un agente causante de la enfermedad, y/o al desarrollo de uno o más
30 síntomas, y en algunas realizaciones, antes, durante y/o poco después de la exposición al agente causante de la enfermedad. En algunas realizaciones, la vacunación incluye múltiples administraciones, adecuada o convenientemente espaciadas en el tiempo, de una composición vacunal.

Como se emplean en el presente documento, los términos "terapéutico" o "agente terapéutico" se refieren a la administración de una composición destinada a disminuir o eliminar uno o más síntomas de
35 la infección por hMPV. Un agente terapéutico puede administrarse antes, durante y/o después de la exposición al hMPV, y/o al desarrollo de uno o más síntomas. En algunas realizaciones, un agente terapéutico se administra a un sujeto en forma de múltiples administraciones, adecuada o convenientemente espaciadas en el tiempo, de una composición vacunal.

La divulgación describe secuencias de ácidos nucleicos (p. ej., secuencias de ADN y ARN) y secuencias de aminoácidos que tienen un cierto grado de identidad con una secuencia de ácidos nucleicos o una secuencia de aminoácidos determinada, respectivamente (p. ej., con una secuencia de referencia).

5 Los términos "% idéntico", "% de identidad" o términos similares pretenden referirse, en particular, al porcentaje de nucleótidos o aminoácidos que son idénticos en un alineamiento óptimo entre las secuencias que se van a comparar. La "identidad de secuencia" entre dos secuencias de ácido nucleico indica el porcentaje de nucleótidos que son idénticos entre las secuencias. La "identidad de secuencia" entre dos secuencias de aminoácidos indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las
10 secuencias. Dicho porcentaje es puramente estadístico, y las diferencias entre las dos secuencias pueden ser, aunque no necesariamente, distribuidas al azar en toda la longitud de las secuencias que se van a comparar. Las comparaciones de dos secuencias suelen realizarse comparando dichas secuencias, tras el alineamiento óptimo, con respecto a un segmento o "ventana de comparación", con el fin de identificar las regiones locales de las secuencias correspondientes. El alineamiento óptimo para
15 una comparación puede realizarse manualmente o con la ayuda del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482, con la ayuda del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, con la ayuda del algoritmo de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 2444, o con la ayuda de programas informáticos que utilizan dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin
20 Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.)

El porcentaje de identidad se obtiene determinando el número de posiciones idénticas en las que se corresponden las secuencias a comparar, dividiendo este número por el número de posiciones comparadas (p. ej., el número de posiciones de la secuencia de referencia) y multiplicando este resultado por 100.

25 En algunas realizaciones, el grado de identidad se proporciona para una región que es al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, o aproximadamente 100% de la longitud total de la secuencia de referencia. Por ejemplo, si la secuencia de ácido nucleico de referencia consiste en 200 nucleótidos, el grado de identidad se proporciona para al menos aproximadamente 100, al menos
30 aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 180 o aproximadamente 200 nucleótidos, en algunas realizaciones, en nucleótidos continuos. En algunas realizaciones, el grado de identidad se proporciona para toda la longitud de la secuencia de referencia.

Las secuencias de ácido nucleico o las secuencias de aminoácidos que tienen un grado particular
35 de identidad con una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos dada, respectivamente, pueden tener al menos una propiedad funcional de dicha secuencia dada, p. ej., y en algunos casos, son funcionalmente equivalentes a dicha secuencia dada. En algunas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos que tienen un grado particular de identidad con una secuencia

de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos dadas es funcionalmente equivalente a dicha secuencia dada.

Como se emplea en el presente documento, el término "kit" se refiere a un conjunto empaquetado de componentes relacionados, tales como uno o más compuestos o composiciones y uno o más materiales relacionados, tales como disolventes, soluciones, tampones, instrucciones o desecantes.

II. Antígenos del polipéptido F de hMPV

El metapneumovirus humano (hMPV) es un virus de ARN de hebra sencilla de sentido negativo que pertenece a la subfamilia de los neumovirus dentro de la familia de los paramixovirus. El hMPV infecta las células epiteliales de las vías respiratorias en la nariz y el pulmón y es la segunda causa más común, después del virus respiratorio sincitial (VRS), de infección de las vías respiratorias bajas en niños pequeños. El hMPV es un virus envuelto con una glicoproteína (proteína G), una pequeña proteína hidrófoba (proteína SH) y una proteína de fusión (proteína F) sobre la superficie del virión.

Al tratarse de un virus con envoltura, la entrada del hMPV a las células anfitrionas requiere la fusión de las membranas viral y celular. La entrada de paramixovirus suele requerir dos glicoproteínas virales, la de fusión (F) y la de anclaje (G, H o HN), y la fusión de membranas promovida por todas las glicoproteínas de paramixovirus que se han examinado tiene lugar a pH neutro, con una posible excepción (es decir, el virus SER). Además de la fusión de membranas entre virus y células, las glicoproteínas de paramixovirus también promueven la fusión entre células. En los tejidos infectados por diversos paramixovirus pueden encontrarse células gigantes multinucleadas, denominadas sincitios. Las células cultivadas infectadas por el hMPV forman sincitios, pero el examen de las células epiteliales primarias de las vías respiratorias humanas infectadas por el hMPV sugiere que la formación de sincitios por este virus puede no ser un hecho común *in vivo*.

El F de hMPV es una glicoproteína de fusión de clase I que se sintetiza como un precursor inactivo (F0) que necesita ser escindido para ser competente para la fusión. La escisión proteolítica genera dos subunidades conectadas por disulfuro (F2 N-terminal a F1) que se ensamblan en un homotrímero. La escisión se produce en un sitio de escisión monobásico aguas arriba del péptido de fusión hidrófobo. La escisión puede lograrse en el cultivo de tejidos mediante la adición de tripsina exógena al medio o mediante la adición de un plásmido de expresión de furina. Sin embargo, *in vivo*, se cree que otras serina proteasas, tales como TMPRSS2, son probablemente más relevantes para la escisión. El trímero de F se incorpora a la partícula del virus en una conformación metaestable, "prefusión" o "pre-F". Para iniciar la fusión de la membrana, F de hMPV se activa y experimenta una serie de cambios conformacionales escalonados en la proteína F que impulsan la fusión de la membrana y hacen que F de hMPV adopte una conformación "postfusión" o "post-F" altamente estable.

En ciertas realizaciones ilustrativas, la escisión proteolítica de F0 se logra mediante la cotransfección de un plásmido que codifica un polipéptido F de hMPV y un plásmido que codifica furina a una razón 4:1 de plásmido de hMPV : plásmido de furina.

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos antigénicos de hMPV que comprenden un polipéptido F de hMPV. El polipéptido F de hMPV puede comprender toda la secuencia de F de hMPV

o una porción de F de hMPV. En ciertas realizaciones, la porción es el ectodominio.

En algunas realizaciones, el polipéptido F de hMPV comprende una secuencia que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99.5% de identidad con uno cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3, 5 y 7.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido F de hMPV comprende un polipéptido F de hMPV modificado que tiene al menos 80% de identidad con los polipéptidos de uno cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3, 5 y 7, en donde el polipéptido F de hMPV es antigénico.

En algunas realizaciones, el polipéptido F de hMPV comprende sólo la porción del ectodominio de la proteína F.

10 La secuencia de aminoácidos de F0 para A2-CAN97-83 es:

MSWKVVIIFSLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDL
TKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNALKTNE
AVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAI
SLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAA
15 PSCSEKKGNACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTN
YPCKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKV
EGEQHVIGRVPVSSSFDPKFPEDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKGNT**GFIIVILIAVLGSS**

20 **MILVSIFIIKKTKKPTGAPPELSGVTNNGFIPHN** (SEQ ID NO: 1). (Acceso AAN52910; Versión AAN52910.1; Acceso Fuente DB AY145296.1.) El dominio transmembrana está en negrita y subrayado, y la cola citoplásmica está en negrita.

La secuencia de nucleótidos de F0 para A2-CAN97-83 es:

ATGTCTTGGAAGTGGTGATCATTTTTTCATTGCTAATAACACCTCAACACGGTCTTAAAGAGAGCTAC
CTAGAAGAATCATGTAGCACTATAACTGAGGGATATCTTAGTGTTCTGAGGACAGGTTGGTATACCAA
CGTTTTTACATTAGAGGTGGGTGATGTAGAAAACCTTACATGTTCTGATGGACCTAGCCTAATAAAAA
25 CAGAATTAGATCTGACCAAAAGTGCACCTAAGAGAGCTCAAAACAGTCTCTGCTGACCAATTGGCAAGA
GAGGAACAAATTGAGAATCCCAGACAATCTAGGTTTGTCTAGGAGCAATAGCACTCGGTGTTGCAA
CAGCAGCTGCAGTCACAGCAGGTGTTGCAATTGCCAAAACCATCCGGCTTGAGAGTGAAGTCACAGC
AATTAAGAATGCCCTCAAAACGACCAATGAAGCAGTATCTACATTGGGGAATGGAGTTCGAGTGTTG
GCAACTGCAGTGAGAGAGCTGAAAGACTTTGTGAGCAAGAATTTAACTCGTGCAATCAACAAAAACAA
30 GTGCGACATTGATGACCTAAAAATGGCCGTTAGCTTCAGTCAATTCAACAGAAGGTTTCTAAATGTTG
TGCGGCAATTTTCAGACAATGCTGGAATAACACCAGCAATATCTTTGGACTTAATGACAGATGCTGAA
CTAGCCAGGGCCGTTTCTAACATGCCGACATCTGCAGGACAAATAAAATTGATGTTGGAGAACCGTG
CGATGGTGCGAAGAAAGGGGTTCCGAATCCTGATAGGGGTCTACGGGAGCTCCGTAATTTACATGG
TGCAGCTGCCAATCTTTGGCGTTATAGACACGCCTTGCTGGATAGTAAAAGCAGCCCCTTCTTGTTC
35 GAAAAAAAGGGAACTATGCTTGCCTCTTAAGAGAAGACCAAGGGTGGTATTGTCAGAATGCAGGGT
CAACTGTTTACTACCCAAATGAGAAAGACTGTGAAACAAGAGGAGACCATGTCTTTTGCAGACACAGCA
GCGGGAATTAATGTTGCTGAGCAATCAAAGGAGTGCAACATCAACATATCCACTACAAATTACCCATG
CAAAGTCAGCACAGGAAGACATCCTATCAGTATGGTTGCACTGTCTCCTCTTGGGGCTCTGGTTGCT

TGCTACAAAGGAGTAAGCTGTTCCATTGGCAGCAACAGAGTAGGGATCATCAAGCAGCTGAACAAGG
 GTTGCTCCTATATAACCAACCAAGATGCAGACACAGTGACAATAGACAACACTGTATATCAGCTAAGC
 AAAGTTGAGGGTGAACAGCATGTTATAAAAGGCAGACCAGTGTCAAGCAGCTTTGATCCAATCAAGTT
 TCCTGAAGATCAATTCAATGTTGCACTTGACCAAGTTTTTGAGAACATTGAAAACAGCCAGGCCTTGG
 5 TAGATCAATCAAACAGAATCCTAAGCAGTGAGAGAAAGGGAATACTGGCTTCATCATTGTAATAATT
 CTAATTGCTGTCTTGGCTCTAGCATGATCCTAGTGAGCATCTTCATTATAATCAAGAAAACAAAGAAA
 CCAACGGGAGCACCTCCAGAGCTGAGTGGTGTCAAAACAATGGCTTCATACCACATAATTAG (SEQ
 ID NO: 2).

En algunas realizaciones, se bloquea un epítipo de la proteína F de hMPV que se comparte
 10 entre pre-F y post-F. El bloqueo de un epítipo reduce o elimina la generación de anticuerpos contra el
 epítipo cuando se administra a un sujeto un ARN (p. ej., ARNm) que codifica el polipéptido antigénico del
 F de hMPV o cuando se administra a un sujeto un polipéptido antigénico de F de hMPV. Esto puede
 aumentar la proporción de anticuerpos que se dirigen a un epítipo específico de una conformación
 particular de F, Tal como la conformación de pre-fusión (p. ej., anticuerpos que se dirigen al sitio Ø y/o al
 15 sitio V). Dado que F tiene la conformación de pre-fusión en los virus que aún no han entrado en las
 células, una mayor proporción de anticuerpos que se dirigen a pre-F puede proporcionar un mayor grado
 de neutralización (p. ej., expresado como una razón de neutralización con respecto a unión, como se
 describe en el presente documento).

Los polipéptidos F de hMPV descritos en el presente documento pueden tener delecciones o
 20 sustituciones con relación a la proteína del F de hMPV de tipo salvaje (p. ej., SEQ ID NO: 1).

Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un polipéptido de hMPV: (a) carece de un dominio
 transmembrana y carece de una cola citoplásmica, y comprende un sitio de escisión por proteasa del
 rinovirus humano 3C (RVH-3C); (b) comprende una mutación del sitio de escisión F₀ que comprende
 sustituciones de aminoácidos Q100R y S101R con relación a SEQ ID NO: 1, que reemplazan la
 25 glutamina en la posición de aminoácido 100 por arginina, y que reemplazan la serina en la posición de
 aminoácido 101 por arginina; (c) comprende un péptido señal heterólogo; (d) comprende al menos una
 secuencia etiqueta que es opcionalmente una etiqueta de polihistidina (por ejemplo, una etiqueta 6x His,
 una etiqueta 8x His, etc.) y/o una etiqueta Strep II; y/o (e) comprende un dominio foldón.

En ciertas realizaciones, un polipéptido de hMPV carece de un dominio transmembrana y carece
 30 de una cola citoplásmica, y comprende: una mutación del sitio de escisión F₀ que comprende las
 sustituciones de aminoácidos Q100R y S101R con relación a SEQ ID NO: 1; que reemplazan la
 glutamina en la posición 100 del aminoácido por arginina, y que reemplazan la serina en la posición 101
 del aminoácido por arginina; un sitio de escisión por proteasa del rinovirus humano 3C (RVH-3C); un
 péptido señal heterólogo; una etiqueta de polihistidina (p. ej., una etiqueta 6x His, una etiqueta 8x His,
 35 etc.) y/o una etiqueta Strep II; y un dominio foldón.

En ciertas realizaciones, un polipéptido de hMPV incluye una sustitución de valina, alanina,
 glicina, isoleucina, leucina o prolina en la posición 185 de SEQ ID NO: 1.

En ciertas realizaciones, un polipéptido de hMPV incluye una sustitución de fenilalanina,

triptófano, tirosina, valina, alanina, isoleucina o leucina en la posición 160 de SEQ ID NO: 1, y/o una sustitución de valina, alanina, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina o prolina en la posición 46 de SEQ ID NO: 1.

En ciertas realizaciones, un polipéptido de hMPV incluye una sustitución en la posición 160 de SEQ ID NO: 1 y una sustitución en la posición 46 de SEQ ID NO: 1 en donde las sustituciones son "sustituciones estabilizadoras" que estabilizan la estructura terciaria y/o cuaternaria de un polipéptido de hMPV. Las sustituciones estabilizadoras incluyen, pero no se limitan a, la sustitución de: aminoácidos hidrófobos (p. ej., glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina, triptófano, prolina y metionina); aminoácidos hidrófilos (p. ej., cisteína, serina, treonina, asparragina y glutamina; aminoácidos que forman un enlace disulfuro (p. ej., cisteína); aminoácidos que forman enlaces de hidrógeno (p. ej., triptófano, histidina, tirosina y fenilalanina); aminoácidos cargados (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, lisina e histidina), y similares.

En ciertas realizaciones, un polipéptido de hMPV es de una cepa A de hMPV (p. ej., un subtipo A1 o un subtipo A2) o de una cepa B de hMPV (p. ej., un subtipo B1 o un subtipo B2).

En ciertas realizaciones, se proporciona una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia polipeptídica F0 de la "cadena principal", establecida como:

MSWKVVIIFSLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCS DGPSLIKTEL DL
TKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRrrRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNALKTTNEA
VSTLGN GVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISL
DLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPS
CSEKKGNYACLLREDQGWYCNAGSTVYYPNEKDCETRGDHFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYP
CKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEG
EQHVIKGRPVS S SFDPIKFPEDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTggggsgyipeaprdgqay
vrkdgevvllstflgrslevlfqgpgghhhhhhhhsawshpqfek (SEQ ID NO: 3).

En ciertas realizaciones, se proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia polipeptídica F0 de la "cadena principal", establecida como:

ATGAGTTGGAAGGTGGTGATTATCTTCTCCCTGCTGATTACACCACAACATGGACTGAAAGAGTCCTA
CTTGAGGAGTCTCTGTAGCACCATCACAGAGGGCTACCTGTCTGTGCTGAGGACAGGCTGGTACAC
CAATGTGTTACCTTGGAGGTGGGAGATGTGGAGAACCTGACTTGTTCTGATGGACCATCCCTGATT
AAGACAGAACTGGACCTGACCAAGTCTGCCCTGAGGGAACCTGAAAACAGTGTCTGCTGACCAACTTG
CCAGGGAGGAACAGATTGAGAACCCAAGGAGGAGGAGTTTGTGCTGGGAGCCATTGCCCTGGGA
GTGGCTACAGCAGCAGCAGTGACAGCAGGAGTGGCTATTGCCAAGACCATCAGATTGGAGTCTGAG
GTGACAGCCATCAAGAATGCCCTGAAAACCAACATGAGGCTGTGAGCACCTGGGCAATGGAGTG
AGGGTGCTGGCTACAGCAGTGAGGGAACCTGAAAGACTTTGTGAGCAAGAACCTGACCAGGGCTATC
AACAAGAACAAGTGTGACATCGATGACCTGAAAATGGCTGTGTCCTTCAGCCAGTTCAACAGGAGGT
TCCTGAATGTGGTGAGACAGTTCTCTGACAATGCTGGCATCACACCTGCCATCTCCCTGGACCTGAT
GACAGATGCTGAACCTGGCAAGGGCTGTGAGCAATATGCCAACCTCTGCTGGACAAATCAAACCTGATG
TTGGAGAACAGGGCTATGGTGAGGAGGAAGGGCTTTGGCATCCTGATTGGAGTCTATGGCTCCTCT

GTGATTTATATGGTCCAACCTTCCAATCTTTGGAGTGATTGACACACCATGTTGGATTGTGAAGGCTGC
 CCCATCCTGTTCTGAGAAGAAGGGCAACTATGCCTGTCTGCTGAGGGAGGACCAGGGCTGGTATTG
 TCAGAAATGCTGGCAGCACAGTCTACTACCCAAATGAGAAGGACTGTGAGACCAGGGGAGACCATGT
 GTTCTGTGACACAGCAGCAGGCATCAATGTGGCTGAACAGAGCAAGGAGTGTAACATCAACATCAGC
 5 ACCACCAACTACCCATGTAAGGTGAGCACAGGCAGACACCCAATCAGTATGGTGGCTCTGAGCCCAC
 TGGGAGCCCTGGTGGCTTGTACAAGGGAGTGTCTGTAGCATTGGCAGCAACAGGGTGGGCATCA
 TCAAGCAACTTAACAAGGGCTGTTCTACATCACCAACCAGGATGCTGACACAGTGACCATTGACAA
 CACAGTCTACCAACTTAGCAAGGTGGAGGGAGAACAGCATGTGATTAAGGGCAGACCTGTGTCTCTCC
 TCCTTTGACCCAATCAAGTTTCCTGAGGACCAGTTCAATGTGGCTCTGGACCAGGTGTTTGAGAACAT
 10 TGAGAACAGCCAGGCTCTGGTGGACCAGAGCAACAGGATTCTGTCCTCTGCTGAGAAGGGCAACAC
 AGGAGGAGGAGGCTCTGGCTACATCCCTGAGGCTCCAAGGGATGGACAAGCCTATGTGAGGAAGGA
 TGGAGAGTGGGTGCTGCTGAGCACCTTCCTGGGCAGGTCCTTGGAGGTGCTGTTCCAGGGACCTGG
 ACACCACCACCACCACCACCACCCTCTGCCTGGAGCCACCCACAGTTTGAGAAGTAA (SEQ ID NO:
 4)

15 En ciertas realizaciones, un polipéptido de hMPV comprende una secuencia de hMPV de la
 "cadena principal" establecida como SEQ ID NO: 3, y puede contener opcionalmente una o más
 sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un polipéptido de hMPV incluye una
 sustitución de valina, alanina, glicina, isoleucina, leucina o prolina en la posición 185 de SEQ ID NO: 3.
 En ciertas realizaciones, un polipéptido de hMPV incluye una sustitución de fenilalanina, triptófano o
 20 tirosina en la posición 160 de SEQ ID NO: 3, y/o una sustitución de valina, alanina, glicina, isoleucina,
 leucina o prolina en la posición 46 de SEQ ID NO: 3. En ciertas realizaciones, un polipéptido de hMPV
 incluye una sustitución de arginina en una o ambas posiciones 100 y 101 de SEQ ID NO: 3.

En ciertas realizaciones, un polipéptido de hMPV tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,
 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3.

25 En ciertas realizaciones, se proporciona una secuencia de aminoácidos que comprende una
 secuencia polipeptídica de hMPV, establecida como:

MSWKVVIIFSLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDL
 TKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRrrRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNALKTNEA
 VSTLNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIpDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISL
 30 DLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPS
 CSEKKGNACLLREDQGWYCNAGSTVYYPNEKDCETRGDHFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYP
 CKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEG
 EQHVIKGRPVSSSFDPKFPEDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTggggsgyipeaprdgqay
 vrkdgewvllstflgrslevlfgpgghhhhhhsawshpqfek (SEQ ID NO: 5) (D185P). (Los aminoácidos en
 35 minúsculas denotan una región de conector, motivo foldón, conector, sitio de escisión del RVH-3C,
 conector, etiqueta 8X-His y etiqueta strep-II).

En ciertas realizaciones, se proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica una
 secuencia polipeptídica de hMPV, establecida como:

ATGAGTTGGAAGGTGGTGATTATCTTCTCCCTGCTGATTACACCACAACATGGACTGAAAGA
 GTCCTACTTGGAGGAGTCCTGTAGCACCATCACAGAGGGCTACCTGTCTGTGCTGAGGACAGGCTG
 GTACACCAATGTGTTACCTTGGAGGTGGGAGATGTGGAGAACCTGACTTGTTCTGATGGACCATCC
 CTGATTAAGACAGAACTGGACCTGACCAAGTCTGCCCTGAGGGAAGTGAACACAGTGTCTGCTGACC
 5 AACTTGCCAGGGAGGAACAGATTGAGAACCCAAGGAGGAGGAGGTTTGTGCTGGGAGCCATTGCCC
 TGGGAGTGGCTACAGCAGCAGCAGTGACAGCAGGAGTGGCTATTGCCAAGACCATCAGATTGGAGT
 CTGAGGTGACAGCCATCAAGAATGCCCTGAAAACCAACATGAGGCTGTGAGCACCCCTGGGCAATG
 GAGTGAGGGTGTGGCTACAGCAGTGAGGGAAGTGAAGACTTTGTGAGCAAGAACCTGACCAGGG
 CTATCAACAAGAACAAGTGTGACATCCCTGACCTGAAAATGGCTGTGTCCTTCAGCCAGTTCAACAG
 10 GAGGTTCTGAATGTGGTGAGACAGTTCTCTGACAATGCTGGCATCACACCTGCCATCTCCCTGGAC
 CTGATGACAGATGCTGAACTGGCAAGGGCTGTGAGCAATATGCCAACCTCTGCTGGACAAATCAAAC
 TGATGTTGGAGAACAGGGCTATGGTGAGGAGGAAGGGCTTTGGCATCCTGATTGGAGTCTATGGCT
 CCTCTGTGATTTATATGGTCCAACCTTCCAATCTTTGGAGTGATTGACACACCATGTTGGATTGTGAAG
 GCTGCCCCATCCTGTTCTGAGAAGAAGGGCAACTATGCCTGTCTGCTGAGGGAGGACCAGGGCTGG
 15 TATTGTCAGAATGCTGGCAGCACAGTCTACTACCCAAATGAGAAGGACTGTGAGACCAGGGGAGACC
 ATGTGTTCTGTGACACAGCAGCAGGCATCAATGTGGCTGAACAGAGCAAGGAGTGTAACATCAACAT
 CAGCACCACTAATCCCATGTAAGGTGAGCACAGGCAGACACCCAATCAGTATGGTGGCTCTGAG
 CCCACTGGGAGCCCTGGTGGCTTGTACAAGGGAGTGTCTGTAGCATTGGCAGCAACAGGGTGGG
 CATCATCAAGCAACTTAACAAGGGCTGTTCTACATCACCACCAAGGATGCTGACACAGTGACCATTG
 20 ACAACACAGTCTACCAACTTAGCAAGGTGGAGGGAGAACAGCATGTGATTAAGGGCAGACCTGTGTC
 CTCCTCCTTTGACCCAATCAAGTTTCTGAGGACCAGTTCAATGTGGCTCTGGACCAGGTGTTTGAGA
 ACATTGAGAACAGCCAGGCTCTGGTGGACCAGAGCAACAGGATTCTGTCCTCTGCTGAGAAGGGCA
 ACACAGGAGGAGGAGGCTCTGGCTACATCCCTGAGGCTCCAAGGGATGGACAAGCCTATGTGAGGA
 AGGATGGAGAGTGGGTGCTGCTGAGCACCTTCTGGGCAGGTCCTTGGAGGTGCTGTTCCAGGGAC
 25 CTGGACACCACCACCACCACCACCACCCTCTGCCTGGAGCCACCCACAGTTTGAGAAGTAA (SEQ
 ID NO: 6) (D185P).

En ciertas realizaciones, se proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia polipeptídica de hMPV, establecida como:

ATGTCTTGGAAGTCGTCATCATCTTCTCTCTGCTGATCACCCACAACACGGCCTGAAGGAATCTTA
 30 TCTGGAAGAGTCCTGCTCCACAATCACAGAGGGCTACCTGAGCGTGCTGAGAACCGGCTGGTACAC
 CAACGTGTTCACTCTGGAGGTGGGCGACGTGGAGAACCTGACTTGTAGTGACGGCCCTCCCTGAT
 CAAGACTGAGCTGGACCTGACAAAGAGTGCACTGAGAGAACTCAAGACTGTGTCCGCAGACCAGCT
 GGCCCGCAGGAGCAGATCGAAAATCCTAGACAGTCAAGGTTCTGTCCTGGGAGCCATTGCTCTGGG
 AGTTGCTACAGCTGCCGCTGTGACCGCAGGGGTGGCTATTGCTAAAACCATCAGGCTGGAGTCCGA
 35 AGTGACAGCAATCAAGAATGCCCTGAAGACCACCAACGAGGCAGTCTCCACACTGGGCAATGGAGT
 GAGGGTGCTGGCAACCGCCGTGAGGGAGCTGAAGGACTTCGTGTCCAAGAACCTGACCAGGGCTAT
 CAACAAAAACAAGTGCGACATCCCCGATCTGAAGATGGCAGTTAGCTTTTCCAGTTTAACCGGAGAT
 TCCTGAATGTGGTTAGACAGTTCAGCGACAACGCCGGGATCACCCAGCTATTTCCCTGGACCTGAT

GACTGATGCCGAGCTGGCACGGGCTGTGTCCAATATGCCCACCAGCGCTGGGCAGATTAAGCTGAT
 GCTGGAGAATCGGGCAATGGTGAGAAGGAAGGGGTTTGGCATCCTGATCGGCGTGTACGGGTCCTC
 CGTGATCTACATGGTGCAGCTGCCTATTTTTGGAGTGATTGATACACCCTGCTGGATCGTTAAAGCAG
 CACCCAGCTGCTCCGAGAAGAAGGGCAATTACGCCTGTCTGCTGCGGGAGGACCAGGGGTGGTACT
 5 GCCAGAACGCCGGCTCCACAGTGTATTACCCAATGAAAAGGACTGCGAGACAAGGGGAGACCACG
 TGTCTGCGACACTGCCGCTGGGATTAATGTGGCCGAGCAGAGCAAGGAGTGCAACATCAACATTTT
 CACCACAACTACCCCTGCAAGGTGAGCACCGGCAGGCACCCTATCTCCATGGTGGCCCTGTCTCC
 CCTGGGAGCTCTGGTGGCTTGCTACAAGGGAGTGAGCTGTAGCATCGGGTCCAATAGAGTCGGGAT
 TATCAAGCAGCTGAATAAGGGCTGCAGCTATATTACCAACCAGGATGCCGATACTGTGACTATTGACA
 10 ACACAGTGTATCAGCTGTCAAAGGTGGAAGGCGAACAGCATGTGATCAAAGGACGGCCCGTCAGCA
 GCTCCTTTGACCCTATCAAATCCCCGAAGACCAGTTTAACGTGGCACTGGACCAGGTTTTTCGAAAAT
 ATTGAGAATTCTCAGGCCCTGGTGGACCAGTCTAACCGGATCCTCTCCTCCGCCGAGAAGGGAAATA
 CAGGCTTTATTATCGTGATCATCCTGATCGCAGTGCTGGGATCCAGTATGATCCTGGTCTCCATTTTC
 ATCATCATTAAGAAGACCAAGAAACCCACTGGCGCACCACTGAACTGAGCGGCGTGACTAACAATG
 15 GCTTTATCCCTCACAATTGA (SEQ ID NO: 17) (ARNm de D185P).

En ciertas realizaciones, un polipéptido de hMPV tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,
 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5. En ciertas
 realizaciones, un polipéptido de hMPV comprende SEQ ID NO: 5. En ciertas realizaciones, un
 polinucleótido del hMPV tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o
 20 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6. En ciertas realizaciones, un polinucleótido de hMPV
 comprende SEQ ID NO: 6. En ciertas realizaciones, un polinucleótido de hMPV tiene al menos 80%,
 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID
 NO: 17. En ciertas realizaciones, un polinucleótido de hMPV comprende SEQ ID NO: 17.

En ciertas realizaciones, se proporciona una secuencia de aminoácidos que comprende una
 25 secuencia polipeptídica de hMPV, establecida como:

MSWKVVIIFSLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTWFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELDL
 TKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRrrRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNALKTNEA
 VSTLGNNGVRVLAfAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISL
 DLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAPS
 30 CSEKKGNACLLREDQGWYCNAGSTVYYPNEKDCETRGDHFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYP
 CKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEG
 EQHVIKGRPVSSSFDPKFPEDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTggggsgyipeaprdgqay
 vrkdgewvllstflgrslevlfgpgghhhhhhsawshpqfek (SEQ ID NO: 7) (T160F_N46V). (Los aminoácidos en
 minúsculas denotan una región de conector, motivo de plegado, conector, sitio de escisión del RVH-3C,
 35 conector, etiqueta 8X-His y etiqueta strep II).

En ciertas realizaciones, se proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica una
 secuencia polipeptídica de hMPV, establecida como:

ATGAGTTGGAAGGTGGTGATTATCTTCTCCCTGCTGATTACACCACAACATGGACTGAAAGAGTCCTA

CTTGGAGGAGTCCTGTAGCACCATCACAGAGGGCTACCTGTCTGTGCTGAGGACAGGCTGGTACAC
 AGTGGTGTTACCTTGGAGGTGGGAGATGTGGAGAACCTGACTTGTCTGATGGACCATCCCTGATT
 AAGACAGAACTGGACCTGACCAAGTCTGCCCTGAGGGAACTGAAAACAGTGTCTGCTGACCAACTTG
 CCAGGGAGGAACAGATTGAGAACCCAAGGAGGAGGAGGTTTGTGCTGGGAGCCATTGCCCTGGGA
 5 GTGGCTACAGCAGCAGCAGTGACAGCAGGAGTGGCTATTGCCAAGACCATCAGATTGGAGTCTGAG
 GTGACAGCCATCAAGAATGCCCTGAAAACCAATGAGGCTGTGAGCACCTGGGCAATGGAGTG
 AGGGTGCTGGCTTTTGTGCTGTGAGGGAACTGAAAGACTTTGTGAGCAAGAACCTGACCAGGGCTATCA
 ACAAGAACAAGTGTGACATTGATGACCTGAAAATGGCTGTGTCCTTCAGCCAGTTCAACAGGAGTT
 CCTGAATGTGGTGAGACAGTTCTCTGACAATGCTGGCATCACACCTGCCATCTCCCTGGACCTGATG
 10 ACAGATGCTGAACTGGCAAGGGCTGTGAGCAATATGCCAACCTCTGCTGGACAAATCAAACCTGATGT
 TGGAGAACAGGGCTATGGTGAGGAGGAAGGGCTTTGGCATCCTGATTGGAGTCTATGGCTCCTCTG
 TGATTTATATGGTCCAACCTTCCAATCTTTGGAGTGATTGACACACCATGTTGGATTGTGAAGGCTGCC
 CCATCCTGTTCTGAGAAGAAGGGCAACTATGCCTGTCTGCTGAGGGAGGACCAGGGCTGGTATTGT
 CAGAATGCTGGCAGCACAGTCTACTACCCAAATGAGAAGGACTGTGAGACCAGGGGAGACCATGTG
 15 TTCTGTGACACAGCAGCAGGCATCAATGTGGCTGAACAGAGCAAGGAGTGTAACATCAACATCAGCA
 CCACCAACTACCCATGTAAGGTGAGCACAGGCAGACACCCAATCAGTATGGTGGCTCTGAGCCCACT
 GGGAGCCCTGGTGGCTTGTACAAAGGGAGTGTCTGTAGCATTGGCAGCAACAGGGTGGGCATCAT
 CAAGCAACTTAACAAGGGCTGTTCTACATCACCACAGGATGCTGACACAGTGACCATTGACAAC
 ACAGTCTACCAACTTAGCAAGGTGGAGGGAGAACAGCATGTGATTAAGGGCAGACCTGTGTCCTCCT
 20 CCTTTGACCCAATCAAGTTTCTGAGGACCAGTTCAATGTGGCTCTGGACCAGGTGTTTGAGAACATT
 GAGAACAGCCAGGCTCTGGTGGACCAGAGCAACAGGATTCTGTCCTCTGCTGAGAAGGGCAACACA
 GGAGGAGGAGGCTCTGGCTACATCCCTGAGGCTCCAAGGGATGGACAAGCCTATGTGAGGAAGGAT
 GGAGAGTGGGTGCTGCTGAGCACCTTCCTGGGCAGGTCTTGGAGGTGCTGTTCCAGGGACCTGGA
 CACCACCACCACCACCACCACCTCTGCCTGGAGCCACCCACAGTTTGAGAAGTAA (SEQ ID NO:
 25 8) (T160F_N46V).

En ciertas realizaciones, se proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia polipeptídica de hMPV, establecida como:

ATGAGCTGGAAGGTTGTGATTATTTCTCTCTGCTGATTACTCCACAGCACGGCCTGAAGGAGTCCTA
 CCTGGAGGAGTCCTGTTCTACTATCACTGAGGGGTATCTCTCTGTGCTGCGGACAGGGTGGTATACA
 30 GTGGTGTTACCCCTGGAGGTTGGCGATGTGGAGAATCTGACTTGCAGCGATGGCCCTTCTCTGATCA
 AGACCGAGCTGGATCTGACAAAAAGCGCCCTCAGAGAACTGAAAACCGTGTCGCGCGATCAGCTGG
 CAAGGGAGGAGCAGATCGAGAACCACGGCAGAGCAGGTTTGTGCTGGGCGCTATCGCTCTGGGC
 GTGGCCACTGCAGCTGCTGTCACTGCAGGGGTGCAATCGCTAAGACTATCAGACTGGAATCCGAG
 GTGACCGCCATTAAGAATGCCCTGAAGACTACCAACGAGGCTGTGTCCACTCTGGGAAACGGAGTG
 35 AGGGTCCTGGCCTTCGCAGTGAGGGAGCTGAAGGATTTTGTGTCAAAGAACCTTACACGGGCCATCA
 ACAAGAATAAGTGCGATATCGATGACCTGAAGATGGCCGTGTCCTTCTCCAGTTCAACCGGCGCTT
 TCTGAATGTGGTGCGCCAGTTTTCCGACAACGCTGGAATCACCCCTGCTATCAGCCTGGACCTCATG
 ACCGACGCCGAACCTCGCAAGGGCCGTTTCTAACATGCCTACATCCGCTGGACAGATTAAGCTGATGC

TGGAGAATAGAGCAATGGTGAGGAGAAAGGGATTCCGGCATCCTGATTGGCGTGACGGATCTAGCG
 TGATCTACATGGTGCAGCTGCCGATCTTCGGCGTGATCGATACTCCTTGTTGGATCGTCAAGGCCGC
 CCCTTCCTGCTCCGAGAAGAAGGGCAATTACGCTTGTCTGCTGCGGGAGGACCAGGGCTGGTATTG
 CCAGAACGCCGGGTCTACAGTGTACTATCCTAACGAGAAGGATTGCGAGACCAGAGGCGACCACGT
 5 TTTCTGTGATACAGCCGCCGGAATCAATGTCGCAGAGCAGTCTAAGGAGTGCAACATCAATATCTCTA
 CAACCAATTACCCATGTAAGGTGAGCACTGGACGGCACCCTATCAGTATGGTGGCTCTGAGCCCACT
 GGGGGCACTGGTGGCTTGCTACAAGGGGGTGAGCTGCAGTATCGGCAGTAACAGAGTGGGCATTAT
 CAAGCAGCTGAACAAAGGGTGCTCTTATATTACAAACCAGGATGCAGATACTGTGACCATCGACAAC
 ACTGTGTACCAGCTGTCCAAGGTGGAGGGGGAGCAGCATGTGATCAAAGGGAGACCCGTCTCTTCT
 10 TCTTTCGATCCCATCAAGTTCCTGAAGACCAGTTCATGTTGCCCTGGACCAGGTTTTTCGAGAACAT
 CGAAAATAGCCAGGCCTTGGTCGATCAATCCAACAGGATCCTGAGCAGCGCAGAGAAAGGGAACAC
 TGGCTTCATCATCGTGATCATTCTGATCGCCGTGCTGGGGAGCAGTATGATTCTGGTGTCCATTTTCA
 TCATCATCAAGAAGACCAAGAAGCCTACAGGAGCACCCCTGAGCTGAGCGGAGTGACCAACAACG
 GCTTTATCCCTCACAACCTGA (SEQ ID NO: 18) (T160F_N46V).

15 En ciertas realizaciones, se proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica una
 secuencia polipeptídica de hMPV, establecida como:

ATGAGCTGGAAGGTTGTGATTATTTTCTCTCTGCTGATTACTCCACAGCACGGCCTGAAGGAGTCCTA
 CCTGGAGGAGTCCTGTTCTACTATCACTGAGGGGTATCTCTCTGTGCTGCGGACAGGGTGGTATACA
 GTGGTGTTACCCCTGGAGGTTGGCGATGTGGAGAATCTGACTTGCAGCGATGGCCCTTCTCTGATCA
 20 AGACCGAGCTGGATCTGACAAAAAGCGCCCTCAGAGAACTGAAAACCGTGTCGCCGATCAGCTGG
 CAAGGGAGGAGCAGATCGAGAACCACGGCAGAGCAGGTTTGTGCTGGGCGCTATCGCTCTGGGC
 GTGGCCACTGCAGCTGCTGTCACTGCAGGGGTGCAATCGCTAAGACTATCAGACTGGAATCCGAG
 GTGACCGCCATTAAGAATGCCCTGAAGACTACCAACGAGGCTGTGTCCACTCTGGGAAACGGAGTG
 AGGGTCCTGGCCTTCGCAGTGAGGGAGCTGAAGGATTTTGTGTCAAAGAACCTTACACGGGCCATCA
 25 ACAAGAATAAGTGCGATATCGATGACCTGAAGATGGCCGTGTCCTTCTCCAGTTCAACCGGCGCTT
 TCTGAATGTGGTGCGCCAGTTTTCCGACAACGCTGGAATCACCCCTGCTATCAGCCTGGACCTCATG
 ACCGACGCCGAACCTCGCAAGGGCCGTTTCTAACATGCCTACATCCGCTGGACAGATTAAGCTGATGC
 TGGAGAATAGAGCAATGGTGAGGAGAAAGGGATTCCGGCATCCTGATTGGCGTGACGGATCTAGCG
 TGATCTACATGGTGCAGCTGCCGATCTTCGGCGTGATCGATACTCCTTGTTGGATCGTCAAGGCCGC
 30 CCCTTCCTGCTCCGAGAAGAAGGGCAATTACGCTTGTCTGCTGCGGGAGGACCAGGGCTGGTATTG
 CCAGAACGCCGGGTCTACAGTGTACTATCCTAACGAGAAGGATTGCGAGACCAGAGGCGACCACGT
 TTTCTGTGATACAGCCGCCGGAATCAATGTCGCAGAGCAGTCTAAGGAGTGCAACATCAATATCTCTA
 CAACCAATTACCCATGTAAGGTGAGCACTGGACGGCACCCTATCAGTATGGTGGCTCTGAGCCCACT
 GGGGGCACTGGTGGCTTGCTACAAGGGGGTGAGCTGCAGTATCGGCAGTAACAGAGTGGGCATTAT
 35 CAAGCAGCTGAACAAAGGGTGCTCTTATATTACAAACCAGGATGCAGATACTGTGACCATCGACAAC
 ACTGTGTACCAGCTGTCCAAGGTGGAGGGGGAGCAGCATGTGATCAAAGGGAGACCCGTCTCTTCT
 TCTTTCGATCCCATCAAGTTCCTGAAGACCAGTTCATGTTGCCCTGGACCAGGTTTTTCGAGAACAT
 CGAAAATAGCCAGGCCTTGGTCGATCAATCCAACAGGATCCTGAGCAGCGCAGAGAAAGGGAACAC

TGGCTTCATCATCGTGATCATTCTGATCGCCGTGCTGGGGAGCAGTATGATTCTGGTGTCCATTTTCA
 TCATCATCAAGAAGACCAAGAAGCCTACAGGAGCACCCCCTGAGCTGAGCGGAGTGACCAACAACG
 GCTTTATCCCTCACAACTAA (SEQ ID NO: 19) (T160F_N46V).

En ciertas realizaciones, un polipéptido de hMPV tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,
 5 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 7. En ciertas
 realizaciones, un polipéptido de hMPV comprende SEQ ID NO: 7. En ciertas realizaciones, un
 polinucleótido del hMPV tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o
 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 8. En ciertas realizaciones, un polinucleótido de hMPV
 comprende SEQ ID NO: 8. En ciertas realizaciones, un polinucleótido de hMPV tiene al menos 80%,
 10 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID
 NO: 18. En ciertas realizaciones, un polinucleótido de hMPV comprende SEQ ID NO: 18. En ciertas
 realizaciones, un polinucleótido de hMPV tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,
 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 8. En ciertas realizaciones, un
 polinucleótido de hMPV comprende SEQ ID NO: 8. En ciertas realizaciones, un polinucleótido del hMPV
 15 tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de
 secuencia con SEQ ID NO: 19. En ciertas realizaciones, un polinucleótido del hMPV comprende SEQ ID
 NO: 19.

En general, las posiciones en las construcciones descritas en el presente documento pueden
 mapearse en una secuencia de referencia, p. ej., la secuencia de tipo salvaje de SEQ ID NO: 1 o la
 20 secuencia de la cadena principal de SEQ ID NO: 3, mediante alineamiento por pares, p. ej., utilizando el
 algoritmo de Needleman-Wunsch con parámetros estándar (matriz EBLOSUM62, penalización de hueco
 10, penalización de extensión de hueco 0.5).

III. Antígenos recombinantes del polipéptido F de hMPV

En ciertas realizaciones, las vacunas contra hMPV de la presente divulgación pueden
 25 comprender al menos un antígeno del polipéptido F de hMPV. Los antígenos de polipéptidos F de hMPV
 de la divulgación pueden prepararse por una variedad de métodos. En una realización, se utiliza una
 línea celular anfitriona que puede ser de origen eucariótico o procariótico para la expresión de un
 polipéptido F de hMPV. En una realización, una línea celular anfitriona utilizada para la expresión de un
 polipéptido F de hMPV es de origen bacteriano. En una realización, una línea celular anfitriona utilizada
 30 para la expresión de un polipéptido F de hMPV es de origen mamífero. Pueden determinarse las líneas
 celulares anfitriona particulares que son más adecuadas para el producto génico deseado que se
 expresará en ellas. Las líneas celulares anfitriona ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, DG44 y
 DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI
 (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno T de SV40), CHO (ovario de hámster
 35 chino), R1610 (fibroblasto de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de
 hámster), SP2/O (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocitos
 humanos) y 293 (riñón humano). Las líneas celulares anfitriona suelen estar disponibles en servicios
 comerciales, en la Colección Americana de Cultivos de Tejido (ATCC) o en la bibliografía publicada.

En ciertas realizaciones, pueden utilizarse células de baculovirus para expresar un antígeno del polipéptido F de hMPV descrito en el presente documento. El baculovirus Virus de la Poliedrosis Nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), por ejemplo, puede utilizarse para expresar un polipéptido F de hMPV.

5 Puede construirse un baculovirus recombinante para expresar el polipéptido F de hMPV mediante recombinación homóloga entre el ADN del baculovirus y los plásmidos quiméricos que contienen la secuencia F de hMPV de interés. Los virus recombinantes pueden ser detectados en virtud de su morfología de placa distintiva y purificados hasta homogeneidad.

10 Los polipéptidos recombinantes de F de hMPV pueden producirse en células que incluyen, pero no se limitan a, células derivadas de la especie de lepidóptero *Spodoptera frugiperda*. Otras células de insectos adecuadas que pueden ser infectadas por baculovirus, tales como las de las especies *Bombyx mori*, *Galleria mellonella*, *Trichoplusia ni* o *Lamantia dispar*, también podrían utilizarse como sustrato adecuado para producir el polipéptido recombinante F de hMPV.

15 El polipéptido recombinante de F de hMPV también puede expresarse en otros vectores de expresión, tales como los virus Entomopox (poxvirus de insectos), los virus de la poliedrosis citoplásmica (VPC) y la transformación de células de insectos con la expresión constitutiva del gen recombinante de F de hMPV.

20 La expresión de proteínas recombinantes en baculovirus se describe adicionalmente en la Patente de Estados Unidos Núm. US 5.762.919, incorporada al presente documento como referencia en su totalidad a todos los efectos.

25 En ciertas realizaciones, se pueden utilizar células de algas, p. ej., células microalgales, para expresar un antígeno del polipéptido recombinante de F de hMPV como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la célula microalgal anfitriona es un heteroconte o estramenópilo. En algunas realizaciones, la célula anfitriona microalgal es un miembro del filo Labyrinthulomycota. En algunas realizaciones, la célula anfitriona de Labyrinthulomycota es un miembro del orden Thraustochytriales o del orden Labyrinthales.

30 El sistema de expresión utilizado para la expresión de un antígeno polipeptídico de hMPV en una célula anfitriona microalgal comprende elementos de control reguladores que son activos en las células microalgales. En algunas realizaciones, el sistema de expresión comprende elementos de control reguladores que son activos en células de Labyrinthulomycota. En algunas realizaciones, el sistema de expresión comprende elementos de control reguladores que son activos en traustochytridos. En algunas realizaciones, el sistema de expresión comprende elementos de control reguladores que son activos en Schizochytrium o Thraustochytrium. Muchos elementos de control reguladores, incluidos varios promotores, son activos en diversas especies. Por lo tanto, las secuencias reguladoras pueden utilizarse 35 en un tipo de célula que sea idéntica a la célula de la que se aislaron o pueden utilizarse en un tipo de célula que sea diferente de la célula de la que se aislaron.

En algunas realizaciones, el sistema de expresión utilizado para la producción de polipéptidos de F de hMPV en células microalgales comprende elementos reguladores que se obtienen a partir de

secuencias de Labyrinthulomycota. En algunas realizaciones, el sistema de expresión utilizado para la producción de polipéptidos de F de hMPV en células microalgales comprende elementos reguladores que se obtienen a partir de secuencias que no son de Labyrinthulomycota, incluyendo secuencias derivadas de secuencias de algas que no son de Labyrinthulomycota. En algunas realizaciones, el sistema de expresión comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido F de hMPV, en donde la secuencia de polinucleótidos se asocia con cualquier secuencia promotora, cualquier secuencia terminadora, y/o cualquier otra secuencia reguladora que sea funcional en una célula anfitriona microalgal. Pueden utilizarse secuencias inducibles o constitutivamente activas. En ciertas realizaciones, se proporciona un casete de expresión para la expresión de un polipéptido F de hMPV en una célula anfitriona microalgal, así como células algales que comprenden el mismo.

La expresión microalgal de proteínas recombinantes se describe adicionalmente en las Publicaciones Internacionales WO 2011/082189 y WO 2011/090731, incorporadas a presente documento por referencia en su totalidad a todos los efectos.

En ciertas realizaciones, pueden utilizarse células CHO para expresar un polipéptido F de hMPV descrito en el presente documento. En ciertas realizaciones, se proporciona una línea celular CHO que comprende un vector que expresa F de hMPV. En ciertas realizaciones, dicha línea celular CHO se transfecta (de forma estable o transitoria) con dicho vector. En ciertas realizaciones, dicha línea celular CHO comprende dicho vector integrado en su genoma. Las líneas celulares CHO se utilizan comúnmente para la producción industrial de proteínas, y se conocen muchas líneas celulares CHO que están disponibles comercialmente, p. ej., de la ATCC. Por ejemplo, tales líneas celulares CHO incluyen, p. ej., la línea celular CHO-K1 (número ATCC: CCL-61), la línea celular CHO DP-12 (números ATCC CRL-12444 y 12445), y la línea celular CHO 1-15 (número ATCC CRL-9606).

La producción *in vitro* permite el aumento proporcional para obtener grandes cantidades de los polipéptidos deseados. Los mecanismos para el cultivo de células en condiciones de cultivo de tejidos son conocidos en la técnica e incluyen el cultivo en suspensión homogénea, p. ej., en un reactor de aire o en un reactor de agitación continua, o el cultivo de células inmovilizadas o atrapadas, p. ej., en fibras huecas, microcápsulas, en microesferas de agarosa o en cartuchos cerámicos. Si es necesario y/o se desea, las soluciones de polipéptidos pueden purificarse utilizando métodos de cromatografía habituales, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa, y/o cromatografía de (inmuno-) afinidad.

IV. ARN

En ciertas realizaciones, las vacunas contra el hMPV de la presente divulgación pueden comprender al menos un ácido ribonucleico (ARN) que comprende un ORF que codifica un antígeno polipeptídico de F de hMPV. En ciertas realizaciones, el ARN es un ARN mensajero (ARNm) que comprende un ORF que codifica un antígeno proteico de F de hMPV. En ciertas realizaciones, el ARN (p. ej., ARNm) comprende adicionalmente al menos una UTR 5', una UTR 3', una cola de poli(A), y/o una protección terminal 5'.

En ciertas realizaciones, el antígeno proteico de F de hMPV se establece como

MSWKVVIIFSLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVENLTCSDGPSLIKTELTL
 TKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNALKTNE
 AVSTLGNGVRVLATAVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAIS
 LDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPCWIVKAAP
 5 SCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGRDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNY
 PCKVSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVE
 GEQHVIGRPVSSSFDPKFPEDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTGFIIVILIAVLGSSM
 ILVSIFIIKKTKKPTGAPPELSGVTNNGFIPHN (SEQ ID NO: 9) (A2-D185P).

En ciertas realizaciones, el antígeno proteico de F de hMPV está codificado por un ORF de
 10 ARNm establecido como (SEQ ID NO: 6) (ORF de ARNm A2-D185P).

En ciertas realizaciones, el antígeno proteico de F de hMPV está codificado por un ORF de
 ARNm con codones optimizados establecido como (SEQ ID NO: 17) (ORF de ARNm AD185P).

En ciertas realizaciones, el antígeno proteico de F de hMPV se establece como:

MSWKVVIIFSLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTVFTLEVGDVENLTCSDGPSLI
 15 KTELDTKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNA
 LKTNEAVSTLGNGVRVLAFVRELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNA
 GITPAISLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQLPIFGVIDTPC
 WIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEKDCETRGRDHVFCDTAAGINVAEQSKECNI
 NISTTNYPCVKSTGRHPISMVALSPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTV
 20 YQLSKVEGEQHVIGRPVSSSFDPKFPEDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKGNTGFIIVILI
 AVLGSSMILVSIFIIKKTKKPTGAPPELSGVTNNGFIPHN (SEQ ID NO: 11) (A2-T160F_N46V).

En ciertas realizaciones, el antígeno proteico de F de hMPV está codificado por un ORF de
 ARNm establecido como (SEQ ID NO: 8) (ORF de ARNm A2-T160F_N46V).

En ciertas realizaciones, el antígeno proteico de F de hMPV está codificado por un ORF de
 25 ARNm con codones optimizados establecido como (SEQ ID NO: 18) (ORF de ARNm T160F_N46V).

En ciertas realizaciones, el antígeno proteico de F de hMPV está codificado por un ORF de
 ARNm con codones optimizados establecido como (SEQ ID NO: 19) (ORF de ARNm T160F_N46V).

II. A. Protección terminal 5'

Una protección terminal 5' del ARNm puede proporcionar resistencia a las nucleasas que se
 30 encuentran en la mayoría de las células eucarióticas y promover la eficiencia de la traducción. Se
 conocen varios tipos de protecciones terminal 5'. Una protección terminal de 7-metilguanosina (también
 referida como "m⁷G" o "Cap-0") comprende una guanosina que está unida mediante un enlace 5' - 5' -
 trifosfato al primer nucleótido transcrito.

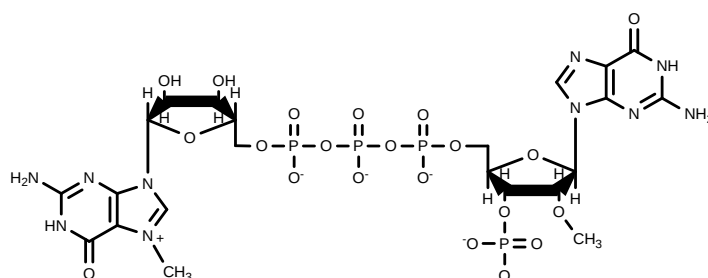
Una protección terminal 5' se añade típicamente de la siguiente manera: primero, una fosfatasa
 35 terminal de ARN elimina uno de los grupos fosfato terminales del nucleótido 5', dejando dos fosfatos
 terminales; el trifosfato de guanosina (GTP) se añade a continuación a los fosfatos terminales a través de
 una guanililtransferasa, produciendo un enlace de trifosfato 5' 5' 5'; y el nitrógeno de la posición 7 de la
 guanina es metilado a continuación por una metiltransferasa. Los ejemplos de estructuras de protección

terminal incluyen, pero no se limitan a, m7G(5')ppp, (5'(A,G(5')ppp(5')A, y G(5')ppp(5')G. Se describen estructuras de protección terminal adicionales en la Publicación de Estados Unidos Núm. US 2016/0032356 y en la Publicación de Estados Unidos Núm. US 2018/0125989, que se incorporan al presente documento como referencia.

La protección terminal 5' de los polinucleótidos puede completarse de forma concomitante durante la reacción de transcripción *in vitro* utilizando los siguientes análogos químicos de protección terminal de ARN para generar la estructura de protección terminal de 5'-guanosina de acuerdo con los protocolos del fabricante: 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G (protección terminal ARCA); G(5')ppp(5')A; G(5')ppp(5')G; m7G(5')ppp(5')A; m7G(5')ppp(5')G; m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG; m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pU; y m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG (New England BioLabs, Ipswich, MA; TriLink Biotechnologies). La protección terminal 5' del ARN modificado puede completarse después de la transcripción utilizando una enzima de protección terminal del virus vaccinia para generar la estructura Cap 0: m7G(5')ppp(5')G. La estructura Cap 1 puede generarse utilizando tanto la enzima de protección terminal del virus vaccinia como una 2'-O metiltransferasa para generar: m7G(5')ppp(5')G-2'-O-metilo. La estructura Cap 2 puede generarse a partir de la estructura Cap 1 seguida de la 2'-O-metilación del antepenúltimo nucleótido 5' utilizando una 2'-O metil-transferasa. La estructura Cap 3 puede generarse a partir de la estructura Cap 2 seguida de la 2'-O-metilación del preantepenúltimo nucleótido 5' utilizando una 2'-O metil-transferasa.

En ciertas realizaciones, el ARNm de la divulgación comprende una protección terminal 5' seleccionada del grupo que consiste en 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G (protección terminal ARCA), G(5')ppp(5')A, G(5')ppp(5')G, m7G(5')ppp(5')A, m7G(5')ppp(5')G, m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG, m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pU, y m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG.

En ciertas realizaciones, el ARNm de la divulgación comprende una protección terminal 5' de:



II. B. Región no traducida (UTR)

En algunas realizaciones, el ARNm de la divulgación incluye una región no traducida (UTR) 5' y/o 3'. En el ARNm, la UTR 5' comienza en el sitio de inicio de la transcripción y continúa hasta el codón de inicio, pero no incluye el codón de inicio. La UTR 3' comienza inmediatamente después del codón de parada y continúa hasta la señal de terminación de la transcripción.

En algunas realizaciones, el ARNm divulgado en el presente documento puede comprender una UTR 5' que incluye uno o más elementos que afectan a la estabilidad o traducción de un ARNm. En algunas realizaciones, una UTR 5' puede tener una longitud de entre 10 y 5.000 nucleótidos. En algunas realizaciones, una UTR 5' puede tener una longitud de entre 50 y 500 nucleótidos. En algunas

realizaciones, la UTR 5' tiene al menos aproximadamente 10 nucleótidos de longitud, aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, aproximadamente 200 nucleótidos de longitud, aproximadamente 250 nucleótidos de longitud, aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, aproximadamente 350 nucleótidos de longitud, aproximadamente 400 nucleótidos de longitud, aproximadamente 450 nucleótidos de longitud, aproximadamente 500 nucleótidos de longitud, aproximadamente 550 nucleótidos de longitud, aproximadamente 600 nucleótidos de longitud, aproximadamente 650 nucleótidos de longitud, aproximadamente 700 nucleótidos de longitud, aproximadamente 750 nucleótidos de longitud, aproximadamente 800 nucleótidos de longitud, aproximadamente 850 nucleótidos de longitud, aproximadamente 900 nucleótidos de longitud, aproximadamente 950 nucleótidos de longitud, aproximadamente 1.000 nucleótidos de longitud, aproximadamente 1.500 nucleótidos de longitud, aproximadamente 2.000 nucleótidos de longitud, aproximadamente 2.500 nucleótidos de longitud, aproximadamente 3.000 nucleótidos de longitud, aproximadamente 3.500 nucleótidos de longitud, aproximadamente 4.000 nucleótidos de longitud, aproximadamente 4.500 nucleótidos de longitud o aproximadamente 5.000 nucleótidos de longitud.

En algunas realizaciones, el ARNm divulgado en el presente documento puede comprender una UTR 3' que comprende uno o más de una señal de poliadenilación, un sitio de unión para proteínas que afectan a la estabilidad de ubicación de un ARNm en una célula, o uno o más sitios de unión para los miARN. En algunas realizaciones, una UTR 3' puede tener una longitud de 50 a 5.000 nucleótidos o más. En algunas realizaciones, una UTR 3' puede tener una longitud de 50 a 1.000 nucleótidos o más. En algunas realizaciones, la UTR 3' tiene al menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, aproximadamente 200 nucleótidos de longitud, aproximadamente 250 nucleótidos de longitud, aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, aproximadamente 350 nucleótidos de longitud, aproximadamente 400 nucleótidos de longitud, aproximadamente 450 nucleótidos de longitud, aproximadamente 500 nucleótidos de longitud, aproximadamente 550 nucleótidos de longitud, aproximadamente 600 nucleótidos de longitud, aproximadamente 650 nucleótidos de longitud, aproximadamente 700 nucleótidos de longitud, aproximadamente 750 nucleótidos de longitud, aproximadamente 800 nucleótidos de longitud, aproximadamente 850 nucleótidos de longitud, aproximadamente 900 nucleótidos de longitud, aproximadamente 950 nucleótidos de longitud, aproximadamente 1.000 nucleótidos de longitud, aproximadamente 1.500 nucleótidos de longitud, aproximadamente 2.000 nucleótidos de longitud, aproximadamente 2.500 nucleótidos de longitud, aproximadamente 3.000 nucleótidos de longitud, aproximadamente 3.500 nucleótidos de longitud, aproximadamente 4.000 nucleótidos de longitud, aproximadamente 4.500 nucleótidos de longitud o aproximadamente 5.000 nucleótidos de longitud.

En algunas realizaciones, el ARNm divulgado en el presente documento puede comprender una UTR 5' o 3' que se obtiene a partir de un gen distinto al codificado por el transcrito del ARNm (es decir, la

UTR es una UTR heteróloga).

En ciertas realizaciones, las secuencias UTR 5' y/o 3' pueden obtenerse a partir de ARNm que son estables (p. ej., globina, actina, GAPDH, tubulina, histona o enzimas del ciclo del ácido cítrico) para aumentar la estabilidad del ARNm. Por ejemplo, una secuencia UTR 5' puede incluir una secuencia parcial de un gen inmediato-temprano 1 (IE1) de CMV, o un fragmento de la misma, para mejorar la resistencia a las nucleasas y/o mejorar la semivida del ARNm. También se contempla la inclusión de una secuencia que codifica la hormona de crecimiento humana (hGH), o un fragmento de la misma, en el extremo 3' o en la región no traducida del ARNm. En general, estas modificaciones mejoran la estabilidad y/o las propiedades farmacocinéticas (p. ej., la semivida) del ARNm con relación a sus homólogos no modificados, e incluyen, por ejemplo, modificaciones realizadas para mejorar la resistencia de dicho ARNm a la digestión por nucleasas *in vivo*.

Las UTR 5' ilustrativas incluyen una secuencia derivada de un gen inmediato-temprano 1 (IE1) de CMV (Publicaciones de Estados Unidos Núm. 2014/0206753 y 2015/0157565, cada una de las cuales se incorpora al presente documento como referencia), o la secuencia GGGAUCCUACC (SEQ ID NO: 16) (Publicación de Estados Unidos Núm. 2016/0151409, incorporada al presente documento como referencia en su totalidad a todos los efectos).

En varias realizaciones, la UTR 5' puede obtenerse a partir de la UTR 5' de un gen TOP. Los genes TOP se caracterizan típicamente por la presencia de un tramo de oligopirimidina (TOP) 5'-terminal. Además, la mayoría de los genes TOP se caracterizan por una regulación traduccional asociada al crecimiento. Sin embargo, también se conocen genes TOP con una regulación traduccional específica del tejido. En ciertas realizaciones, la UTR 5' derivada de la UTR 5' de un gen TOP carece del motivo TOP 5' (el tramo de oligopirimidina) (p. ej., Publicaciones de Estados Unidos Núm. 2017/0029847, 2016/0304883, 2016/0235864 y 2016/0166710, cada una de las cuales se incorpora al presente documento como referencia).

En ciertas realizaciones, la UTR 5' se obtiene a partir de un gen de la proteína ribosómica Grande 32 (L32) (Publicación de Estados Unidos Núm. 2017/0029847, más arriba).

En ciertas realizaciones, la UTR 5' se obtiene a partir de la UTR 5' de un gen de la hidroxisteroide (17-b) deshidrogenasa 4 (HSD17B4) (Publicación de Estados Unidos Núm. 2016/0166710, más arriba).

En ciertas realizaciones, la UTR 5' se obtiene a partir de la UTR 5' de un gen ATP5A1 (Publicación de Estados Unidos Núm. 2016/0166710, más arriba).

En algunas realizaciones, se utiliza un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) en lugar de una UTR 5'.

En algunas realizaciones, la UTR 5' comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en

SEQ	ID	NO:	13:
GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACCGGGACCGAUC			
CAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUCCCCGUGCCAAGAGUGACUCACCG			
UCCUUGACACG. En algunas realizaciones, la UTR 3' comprende una secuencia de ácido nucleico			

establecida en SEQ ID NO: 14:
 CGGGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUG
 CCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUC. La UTR 5' y la UTR 3' se describen con más
 detalle en la Publicación Internacional Núm. WO 2012/075040, incorporada al presente documento como
 5 por referencia.

II. C. Cola poliadenilada

Como se emplean en el presente documento, los términos "secuencia de poli(A)", "cola de
 poli(A)" y "región de poli(A)" se refieren a una secuencia de nucleótidos de adenosina en el extremo 3' de
 la molécula de ARNm. La cola de poli(A) puede conferir estabilidad al ARNm y protegerlo de la
 10 degradación por exonucleasas. La cola de poli(A) puede mejorar la traducción. En algunas realizaciones,
 la cola de poli(A) es esencialmente homopolimérica. Por ejemplo, una cola de poli(A) de 100 nucleótidos
 de adenosina puede tener esencialmente una longitud de 100 nucleótidos. En ciertas realizaciones, la
 cola de poli(A) puede estar interrumpida por al menos un nucleótido diferente de un nucleótido de
 adenosina (p. ej., un nucleótido que no es un nucleótido de adenosina). Por ejemplo, una cola de poli(A)
 15 de 100 nucleótidos de adenosina puede tener una longitud de más de 100 nucleótidos (que comprende
 100 nucleótidos de adenosina y al menos un nucleótido, o un tramo de nucleótidos, que son diferentes de
 un nucleótido de adenosina). En ciertas realizaciones, la cola de poli(A) comprende la secuencia
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAUAUGACUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 15).

20 La "cola de poli(A)", como se emplea en el presente documento, se refiere típicamente a ARN.
 Sin embargo, en el contexto de la divulgación, el término se refiere igualmente a las secuencias
 correspondientes en una molécula de ADN (p. ej., una "secuencia de poli(T)").

La cola de poli(A) puede comprender de aproximadamente 10 a aproximadamente 500
 nucleótidos de adenosina, de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 nucleótidos de adenosina,
 25 de aproximadamente 40 a aproximadamente 200 nucleótidos de adenosina, o de aproximadamente 40 a
 aproximadamente 150 nucleótidos de adenosina. La longitud de la cola de poli(A) puede ser de al menos
 aproximadamente 10, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 nucleótidos de adenosina.

En algunas realizaciones en las que el ácido nucleico es un ARN, la cola de poli(A) del ácido
 nucleico se obtiene a partir de un molde de ADN durante la transcripción *in vitro* del ARN. En ciertas
 30 realizaciones, la cola de poli(A) se obtiene *in vitro* mediante métodos comunes de síntesis química sin
 que se transcriba a partir de un molde de ADN. En varias realizaciones, las colas de poli(A) se generan
 por poliadenilación enzimática del ARN (después de la transcripción *in vitro* del ARN) utilizando kits de
 poliadenilación disponibles en el mercado y los protocolos correspondientes, o alternativamente,
 utilizando polimerasas de poli(A) inmovilizadas, p. ej., utilizando métodos como los descritos en la
 35 Publicación Internacional Núm. WO 2016/174271.

El ácido nucleico puede comprender una cola de poli(A) obtenida por poliadenilación enzimática,
 en donde la mayoría de las moléculas de ácido nucleico comprenden de aproximadamente 100 (+/-20) a
 aproximadamente 500 (+/-50) o aproximadamente 250 (+/-20) nucleótidos de adenosina.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico puede comprender una cola de poli(A) obtenida a partir de un ADN molde y puede comprender adicionalmente al menos una cola de poli(A) adicional generada por poliadenilación enzimática, p. ej., como se describe en la Publicación Internacional Núm. WO 2016/091391.

- 5 En ciertas realizaciones, el ácido nucleico comprende al menos una señal de poliadenilación.
- En varias realizaciones, el ácido nucleico puede comprender al menos una secuencia de poli(C).
- Se pretende que el término "secuencia de poli(C)", como se emplea en el presente documento, sea una secuencia de nucleótidos de citosina de hasta aproximadamente 200 nucleótidos de citosina. En algunas realizaciones, la secuencia de poli(C) comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente
- 10 200 nucleótidos de citosina, de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos de citosina, de aproximadamente 20 a aproximadamente 70 nucleótidos de citosina, de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 nucleótidos de citosina, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 nucleótidos de citosina. En algunas realizaciones, la secuencia de poli(C) comprende aproximadamente 30 nucleótidos de citosina.

15 **II. D. Modificación química**

El ARNm divulgado en el presente documento puede estar modificado o sin modificar. En algunas realizaciones, el ARNm puede comprender al menos una modificación química. En algunas realizaciones, el ARNm divulgado en el presente documento puede contener una o más modificaciones que típicamente mejoran la estabilidad del ARN. Las modificaciones ilustrativas pueden incluir modificaciones de la

20 cadena principal, modificaciones de los azúcares o modificaciones de las bases. En algunas realizaciones, el ARNm divulgado puede sintetizarse a partir de nucleótidos naturales y/o análogos de nucleótidos (nucleótidos modificados) incluyendo, pero sin limitarse a, purinas (adenina (A) y guanina (G)) o pirimidinas (timina (T), citosina (C) y uracilo (U)). En ciertas realizaciones, el ARNm divulgado puede sintetizarse a partir de análogos de nucleótidos modificados o derivados de purinas y pirimidinas, tales

25 como, p. ej. 1-metil-adenina, 2-metil-adenina, 2-metiltio-N-6-isopentenil-adenina, N6-metil-adenina, N6-isopentenil-adenina, 2-tio-citosina, 3-metil-citosina, 4-acetil-citosina, 5-metil-citosina, 2,6-diaminopurina, 1-metil-guanina, 2-metil-guanina, 2,2-dimetil-guanina, 7-metil-guanina, inosina, 1-metil-inosina, pseudouracilo (5-uracilo), dihidro-uracilo, 2-tio-uracilo, 4-tio-uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tio-uracilo, 5-(carboxihidroximetil)-uracilo, 5-fluoro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-carboximetilaminometil-uracilo, 5-metil-

30 2-tio-uracilo, 5-metil-uracilo, éster metílico del ácido N-uracil-5-oxi acético, 5-metilaminometil-uracilo, 5-metilaminometil-2-tio-uracilo, 5'-metoxycarbonilmetil-uracilo, 5-metoxi-uracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 1-metil-pseudouracilo, queosina, β -D-manosil-queosina, fosforamidatos, fosforotioatos, nucleótidos peptídicos, metilfosfonatos, 7-desazaguanosina, 5-metilcitosina e inosina.

- 35 En algunas realizaciones, el ARNm divulgado puede comprender al menos una modificación química que incluye, pero no se limita a, pseudouridina, N1-metilpseudouridina, 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitosina, 2-tio-l-metil-1-desaza-pseudouridina, 2-tio-l-metil-pseudouridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-

pseudouridina, 4-tio-l-metil-pseudouridina, 4-tio-pseudouridina, 5-aza-uridina, dihidropseudouridina, 5-metiluridina, 5-metiluridina, 5-metoxiuridina, y 2'-O-metil uridina.

En algunas realizaciones, la modificación química se selecciona del grupo que consiste en pseudouridina, N1-metilpseudouridina, 5-metilcitosina, 5-metoxiuridina y una combinación de las mismas.

5 En algunas realizaciones, la modificación química comprende N1-metilpseudouridina.

En algunas realizaciones, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o 100% de los nucleótidos de uracilo en el ARNm están modificados químicamente.

10 En algunas realizaciones, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o 100% de los nucleótidos de uracilo en el ORF están modificados químicamente.

La preparación de tales análogos se describe, p. ej., en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.373.071, Patente de Estados Unidos Núm. 4.401.796, Patente de Estados Unidos Núm. 4.415.732, Patente de Estados Unidos Núm. 4.458.066, Patente de Estados Unidos Núm. 4.500.707, Patente de Estados Unidos Núm. 4.668.777, Patente de Estados Unidos Núm. 4.973.679, Patente de Estados Unidos Núm. 5.047.524, Patente de Estados Unidos Núm. 5.132.418, Patente de Estados Unidos Núm. 5.153.319, Patente de Estados Unidos Núm. 5.262.530, y Patente de Estados Unidos Núm. 5.700.642.

II. E. Síntesis de ARNm

20 Los ARNm divulgados en el presente documento pueden sintetizarse de acuerdo con cualquiera de una variedad de métodos. Por ejemplo, los ARNm según la presente divulgación pueden sintetizarse mediante transcripción *in vitro* (TIV). Algunos métodos de transcripción *in vitro* son descritos, p. ej., por Geall et al. (2013) en Semin. Immunol. 25(2): 152-159; Brunelle et al. en (2013) Methods Enzymol. 530:101-14. Brevemente, la TIV se realiza normalmente con un molde de ADN lineal o circular que contiene un promotor, un conjunto de ribonucleótidos trifosfato, un sistema de tampón que puede incluir DTT e iones de magnesio, una ARN polimerasa adecuada (p. ej., ARN polimerasa de T3, T7 o SP6), ADNasa I, pirofosfatasa y/o inhibidor de ARNasa. Las condiciones exactas pueden variar según la aplicación específica. La presencia de estos reactivos es generalmente indeseable en un producto final de ARNm y estos reactivos pueden considerarse impurezas o contaminantes que pueden purificarse o eliminarse para proporcionar un ARNm limpio y/u homogéneo que sea adecuado para el uso terapéutico.

30 Aunque el ARNm proporcionado a partir de reacciones de transcripción *in vitro* puede ser deseable en algunas realizaciones, pueden utilizarse otras fuentes de ARNm según la presente divulgación, incluyendo ARNm de tipo salvaje producido a partir de bacterias, hongos, plantas y/o animales.

V. Nanopartículas lipídicas (NPL)

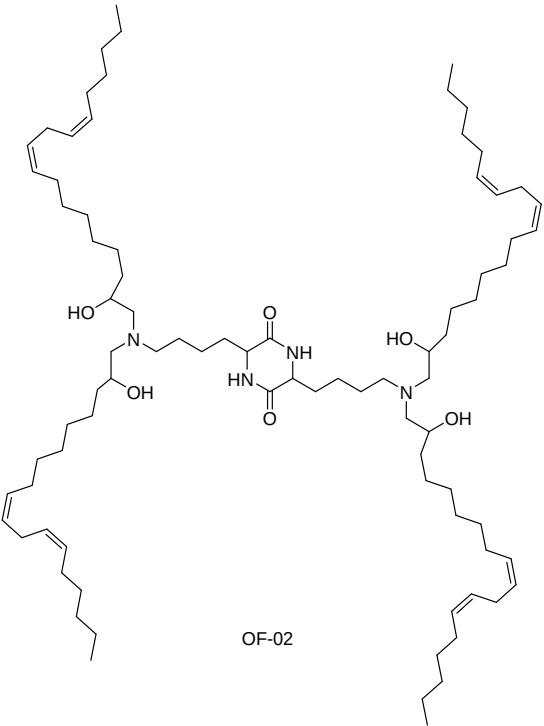
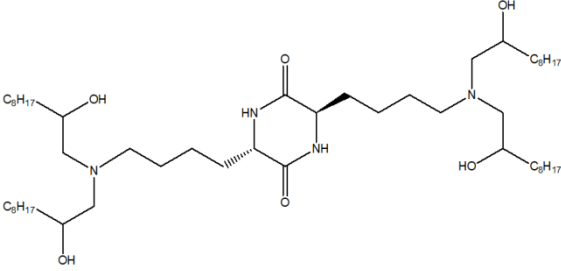
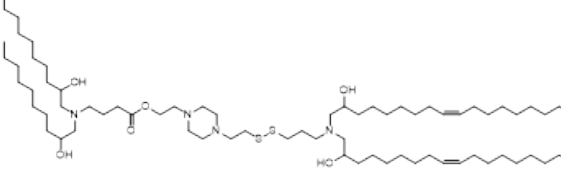
35 Las NPL de la divulgación pueden comprender cuatro categorías de lípidos: (i) un lípido ionizable (p. ej., un lípido catiónico); (ii) un lípido PEGilado; (iii) un lípido basado en colesterol (p. ej., colesterol), y (iv) un lípido auxiliar.

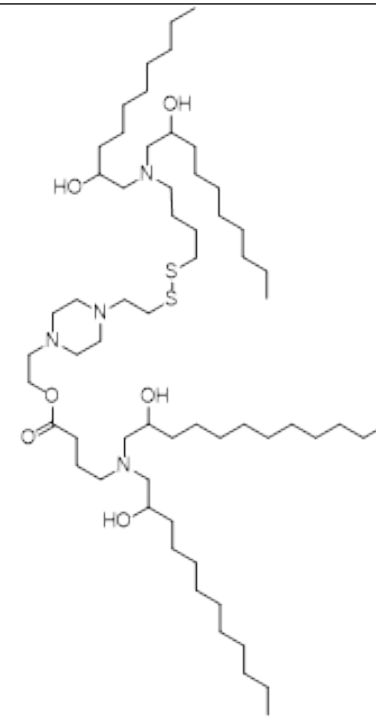
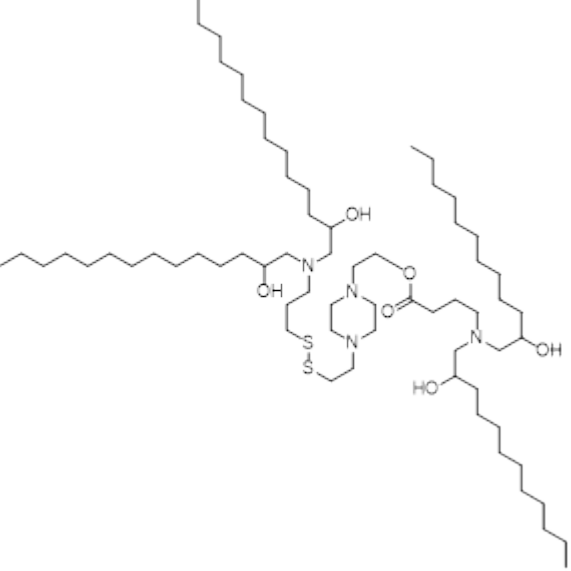
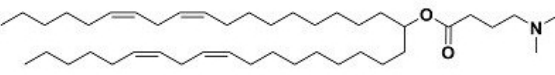
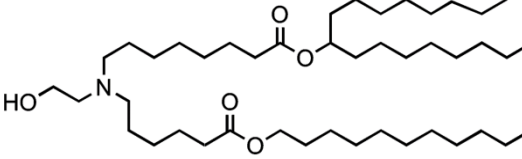
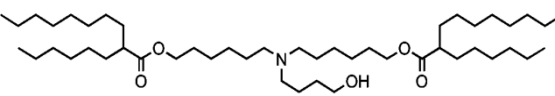
A. Lípido catiónico

Un lípido ionizable facilita la encapsulación del ARNm y puede ser un lípido catiónico. Un lípido

catiónico proporciona un entorno cargado positivamente a bajo pH para facilitar la encapsulación eficiente de la sustancia farmacológica de ARNm cargada negativamente. Los lípidos catiónicos ilustrativos se muestran a continuación en la **Tabla 1**.

Tabla 1 - Lípidos ionizables

Nombre	Estructura
OF-02 (ML7)	
cKK-E10	
GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1 4-(Bis(2-hidroxidecil)amino)-butanoato de ((2-(4-(2-((3Bis((Z)-2-hidroxiocetadec-9-en-1- il)amino)propil) disulfanoil)etil) piperazin-1- il)etilo	

GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 4-(Bis(2-hidroxidodecil)amino)-butanoato de (2-(4-(2-((3-(bis(2-hidroxidecil)amino) butil)disulfanoil)etil) piperazin-1-il)etilo	
GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 4-(Bis(2-hidroxidodecil)amino)butanoato de (2-(4-(2-((3-(bis(2- hidroxitetradecil)amino)propil)disulfanoil)etil) piperazin-1-il)etilo	
MC3	
SM-102 8-((2-Hidroxi)etil)[6-oxo-6-(undeciloxi)hexil] amino}octanoato) de 9-heptadecanilo	
ALC-0315 Bis(2-hexildecanoato) de [(4- hidroxibutil)azanodiil] di(hexano-6,1-diilo)	

El lípido catiónico puede seleccionarse del grupo que comprende [ckkE10] / [OF-02], 4-(dimetilamino)butanoato de [(6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo] (D-Lin-MC3-DMA); 2,2-dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (DLin-KC2-DMA); 1,2-dilinoileloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DLin-DMA); 9-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)heptadecanodioato de di((Z)-non-2-en-1-ilo) (L319); 8-((2-hidroxietyl)[6-oxo-6-(undeciloxi)hexil]amino)octanoato de 9-heptadecanilo (SM-102); bis(2-hexildecanoato) de [(4-hidroxibutil)azanodiil]di(hexano-6,1-diilo) (ALC-0315); (Z)-octadec-9-enoato de [3-(dimetilamino)-2-[(Z)-octadec-9-enil]oxipropilo] (DODAP); 2,5-bis(3-aminopropilamino)-N-[2-[di(heptadecil)amino]-2-oxoetil]pentanamida (DOGS); N-[2-(dimetilamino)etil]carbamato de [(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-[(2R)-6-metilheptan-2-il]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo] (DC-Col); bis(propano-3,1-diil)bis(azanotriil)tetrapropionato de tetrakis(8-metilnonil)-3,3',3'',3'''-((metilazanodiilo) (306Oi10); fosfato de decil(2-(dioctilamonio)etilo) (9A1P9); 5,5-di((Z)-heptadec-8-en-1-il)-1-(3-(pirrolidin-1-il)propil)-2,5-dihidro-1H-imidazol-2-carboxilato de etilo (A2-Iso5-2DC18); 3,3'-((3-metil-9-oxo-10-oxa-13,14-ditia-3,6-diazahexacosil)azanodiil)dipropionato de bis(2-(dodecildisulfanil)etilo) (BAME-O16B); 1,1'-((2-(4-(2-((bis(2-hidroxidodecil)amino)etil) (2-hidroxidodecil)amino)etil)piperazin-1-il)etil)azanodiil) bis(dodecan-2-ol) (C12-200); 3,6-bis(4-(bis(2-hidroxidodecil)amino)butil)piperazino-2,5-diona (cKK-E12); 9,9',9'',9''',9''''-((((benceno-1,3,5-tricarbonil)tris(azanodiil)) tris(propano-3,1-diil)) tris(azanotriil))hexanonanoato de hexa(octan-3-ilo) (FTT5); (9Z,9'Z,9''Z,9'''Z,12Z,12'Z,12''Z,12'''Z)-tetrakis (octadeca-9,12-dienoato) de (((3,6-dioxopiperazin-2,5-diil)bis(butano-4,1-diil))bis(azanotriil))tetrakis(etano-2,1-diilo) (OF-Deg-Lin); TT3; N¹,N³,N⁵-tris(3-(didodecilamino)propil)benceno-1,3,5-tricarboxamida; N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropil)amino]-4-[di(3-aminopropil)amino]butilcarboxamido)etil]-3,4-di[oleiloxi]-benzamida (MVL5); 8-((2-hidroxietyl)(8-(noniloxi)-8-oxooctil)amino)octanoato de heptadecano-9-ilo (Lípido 5); y combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones, el lípido catiónico es biodegradable.

En diversas realizaciones, el lípido catiónico no es biodegradable.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico es escindible.

En ciertas realizaciones, el lípido catiónico no es escindible.

Los lípidos catiónicos son descritos con más detalle por Dong et al. (PNAS. 111(11):3955-60. 2014); Fenton et al. (Adv. Mater. 28:2939. 2016); Patente de Estados Unidos Núm. 9.512.073; y Patente de Estados Unidos Núm. 10.201.618, cada una de las cuales se incorpora al presente documento como referencia.

B. Lípido PEGilado

El componente lipídico PEGilado permite controlar el tamaño de las partículas y la estabilidad de la nanopartícula. La adición de tales componentes puede evitar la agregación del complejo y proporcionar un medio para aumentar la vida útil en circulación y aumentar el suministro de la composición farmacéutica del lípido-ácido nucleico a los tejidos diana (Klibanov et al. FEBS Letters 268(1):235-7. 1990). Estos componentes pueden seleccionarse para que se intercambien rápidamente fuera de la composición farmacéutica *in vivo* (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 5.885.613).

Los lípidos PEGilados contemplados incluyen, pero no se limitan a, una cadena de polietilenglicol

(PEG) de hasta 5 kDa de longitud anclada covalentemente a un lípido con una o varias cadenas alquílicas de C₆-C₂₀ (p. ej., C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, o C₁₈) de longitud, tal como una ceramida derivatizada (p. ej., N-octanoil-esfingosina-1-[succinil(metoxipolietilenglicol)] (PEG ceramida C8). En algunas realizaciones, el lípido PEGilado es 1,2-dimiristoil-rac-glicero-3-metoxipolietilenglicol (DMG-PEG); 1,2-
 5 diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-polietilenglicol (DSPE-PEG); 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-polietilenglicol (DLPE-PEG) o 1,2-diestearoil-rac-glicero-polietilenglicol (DSG-PEG), PEG-DAG; PEG-PE; PEG-S-DAG; PEG-S-DMG; PEG-cer; un PEG-dialquiloilpropilcarbamat; 2-[(polietilenglicol)-2000]-N,N-ditetradecilacetamida (ALC-0159); y combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones, el PEG tiene un alto peso molecular, p. ej., 2000-2400 g/mol. En ciertas
 10 realizaciones, el PEG es PEG2000 (o PEG-2K). En ciertas realizaciones, el lípido PEGilado en el presente documento es DMG-PEG2000, DSPE-PEG2000, DLPE-PEG2000, DSG-PEG2000, PEG2000 C8, o ALC-0159 (2-[(polietilenglicol)-2000]-N,N-ditetradecilacetamida). En ciertas realizaciones, el lípido PEGilado en el presente documento es DMG-PEG2000.

C. Lípido basado en colesterol

El componente de colesterol proporciona estabilidad a la estructura de bicapa lipídica dentro de la nanopartícula. En algunas realizaciones, las NPL comprenden uno o más lípidos basados en colesterol. Los lípidos basados en colesterol adecuados incluyen, por ejemplo DC-Choi (N,N-dimetil-N-etilcarboxamidocolesterol), 1,4-bis(3-N-oleilamino-propil)piperazina (Gao et al., *Biochem Biophys Res Comm.* (1991) 179:280; Wolf et al., *BioTechniques* (1997) 23:139; Patente de Estados Unidos Núm.
 20 5.744.335), éster de colesterol de imidazol ("ICE"; documento WO 2011/068810), sitosterol (22,23-dihidroestigmasterol), β -sitosterol, sitostanol, fucosterol, estigmasterol (estigmasta-5,22-dien-3-ol), ergosterol; desmosterol (3 β -hidroxi-5,24-colestadieno); lanosterol (8,24-lanostadien-3b-ol); 7-deshidrocolesterol (Δ 5,7-colesterol); dihidrolanosterol (24,25-dihidrolanosterol); zimosterol (5 α -colest-8,24-dien-3 β -ol); latosterol (5 α -colest-7-en-3 β -ol); diosgenina
 25 ((3 β ,25R)-espirost-5-en-3-ol); campesterol (campest-5-en-3 β -ol); campestanol (5a-campestan-3b-ol); colesterol 24-metileno (5,24(28)-colestadien-24-metilen-3 β -ol); margarato de colesterilo (heptadecanoato de colest-5-en-3 β -ilo); oleato de colesterilo; estearato de colesterilo y otras formas modificadas de colesterol. En algunas realizaciones, el lípido basado en colesterol utilizado en las NPL es el colesterol.

D. Lípido auxiliar

Un lípido auxiliar mejora la estabilidad estructural de la NPL y ayuda a la NPL a escapar del endosoma. Mejora la captación y la liberación de la carga útil del fármaco de ARNm. En algunas realizaciones, el lípido auxiliar es un lípido zwitteriónico, que tiene propiedades fusogénicas para mejorar la captación y liberación de la carga útil del fármaco. Los ejemplos de lípidos auxiliares son 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE); 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC); 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (DOPS); 1,2-dielaidoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DEPE) y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPOC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), DMPC, 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE) y 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DLPE).
 35

Otros lípidos auxiliares ilustrativos son la dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-l-carboxilato de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE-mal), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), fosfatidilserina, esfingolípidos, esfingomielinas, ceramidas, cerebrósidos, gangliósidos, 16-O-monometil PE, 16-O-dimetil PE, 18-1-trans PE, l-estearoil-2-oleoil-fosfatidietanolamina (SOPE), o una combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, el lípido auxiliar es DOPE. En ciertas realizaciones, el lípido auxiliar es DSPC.

En diversas realizaciones, las presentes NPL comprenden (i) un lípido catiónico seleccionado entre OF-02, cKK-E10, GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1, GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, o GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14; (ii) DMG-PEG2000; (iii) colesterol; y (iv) DOPE.

E. Razones molares de los componentes lipídicos

Las razones molares de los componentes mencionados son importantes para la eficacia de las NPL en el suministro de ARNm. La razón molar del lípido catiónico, el lípido PEGilado, el lípido basado en colesterol y el lípido auxiliar es A: B: C: D, donde $A + B + C + D = 100\%$. En algunas realizaciones, la razón molar del lípido catiónico en las NPL con relación al total de lípidos (es decir, A) es de 35-55%, tal como 35-50% (p. ej., 38-42%, tal como 40%, o 45-50%). En algunas realizaciones, la razón molar del componente lipídico PEGilado con relación a los lípidos totales (es decir, B) es de 0.25-2.75% (p. ej., 1-2%, tal como 1.5%). En algunas realizaciones, la razón molar del lípido basado en colesterol con relación a los lípidos totales (es decir, C) es de 20-50% (p. ej., 27-30%, tal como 28.5%, o 38-43%). En algunas realizaciones, la razón molar del lípido auxiliar con relación a los lípidos totales (es decir, D) es de 5-35% (p. ej., 28-32%, tal como 30%, o 8-12%, tal como 10%). En algunas realizaciones, los componentes (lípido PEGilado + colesterol) tienen la misma cantidad molar que el lípido auxiliar. En algunas realizaciones, las NPL contienen una razón molar entre el lípido catiónico y el lípido auxiliar que es superior a 1.

En ciertas realizaciones, la NPL de la divulgación comprende:

un lípido catiónico a una razón molar de 35% a 55% o de 40% a 50% (p. ej., un lípido catiónico a una razón molar de 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54% o 55%);

un lípido conjugado con polietilenglicol (PEG) (PEGilado) a una razón molar de 0.25% a 2.75% o de 1.00% a 2.00% (p. ej., un lípido PEGilado a una razón molar de 0.25%, 0.50%, 0.75%, 1.00%, 1.25%, 1.50%, 1.75%, 2.00%, 2.25%, 2.50% o 2.75%);

un lípido basado en colesterol a una razón molar de 20% a 50%, 25% a 45%, o 28.5% a 43% (p. ej. un lípido a base de colesterol a una razón molar de 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49% o 50%); y

un lípido auxiliar a una razón molar de 5% a 35%, de 8% a 30% o de 10% a 30% (p. ej., un lípido auxiliar a una razón molar de 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%,

19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34% o 35%),
 en donde todas las razones molares son relativas al contenido total de lípidos de la NPL.

En ciertas realizaciones, la NPL comprende: un lípido catiónico a una razón molar de 40%; un
 lípido PEGilado a una razón molar de 1.5%; un lípido basado en colesterol a una razón molar de 28.5%; y
 5 un lípido auxiliar a una razón molar de 30%.

En ciertas realizaciones, el lípido PEGilado es dimiristoil-PEG2000 (DMG-PEG2000).

En diversas realizaciones, el lípido basado en colesterol es el colesterol.

En algunas realizaciones, el lípido auxiliar es 1,2-dioleoil-SN-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE).

En ciertas realizaciones, la NPL comprende: OF-02 a una razón molar de 35% a 55%; DMG-
 10 PEG2000 a una razón molar de 0.25% a 2.75%; colesterol a una razón molar de 20% a 50%; y DOPE a
 una razón molar de 5% a 35%.

En ciertas realizaciones, la NPL comprende: cKK-E10 a una razón molar de 35% a 55%; DMG-
 PEG2000 a una razón molar de 0.25% a 2.75%; colesterol a una razón molar de 20% a 50%; y DOPE a
 una razón molar de 5% a 35%.

15 En ciertas realizaciones, la NPL comprende: GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1 a una razón molar
 de 35% a 55%; DMG-PEG2000 a una razón molar de 0.25% a 2.75%; colesterol a una razón molar de
 20% a 50%; y DOPE a una razón molar de 5% a 35%.

En ciertas realizaciones, la NPL comprende: GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 a una razón molar de
 35% a 55%; DMG-PEG2000 a una razón molar de 0.25% a 2.75%; colesterol a una razón molar de 20%
 20 a 50%; y DOPE a una razón molar de 5% a 35%.

En ciertas realizaciones, la NPL comprende: GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 a una razón molar de
 35% a 55%; DMG-PEG2000 a una razón molar de 0.25% a 2.75%; colesterol a una razón molar de 20%
 a 50%; y DOPE a una razón molar de 5% a 35%.

En ciertas realizaciones, la NPL comprende: SM-102 a una razón molar de 35% a 55%; DMG-
 25 PEG2000 a una razón molar de 0.25% a 2.75%; colesterol a una razón molar de 20% a 50%; y DSPC a
 una razón molar de 5% a 35%.

En ciertas realizaciones, la NPL comprende: ALC-0315 a una razón molar de 35% a 55%; ALC-
 0159 a una razón molar de 0.25% a 2.75%; colesterol a una razón molar de 20% a 50%; y DSPC a una
 razón molar de 5% a 35%.

30 En ciertas realizaciones, la NPL comprende: OF-02 a una razón molar de 40%; DMG-PEG2000 a
 una razón molar de 1.5%; colesterol a una razón molar de 28.5%; y DOPE a una razón molar de 30%.

En ciertas realizaciones, la NPL comprende: cKK-E10 a una razón molar de 40%; DMG-PEG2000
 a una razón molar de 1.5%; colesterol a una razón molar de 28.5%; y DOPE a una razón molar de 30%.

En ciertas realizaciones, la NPL comprende: GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1 a una razón molar
 35 de 40%; DMG-PEG2000 a una razón molar de 1.5%; colesterol a una razón molar de 28.5%; y DOPE a
 una razón molar de 30%.

En ciertas realizaciones, la NPL comprende: GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 (a una razón molar de
 40%; DMG-PEG2000 a una razón molar de 1.5%; colesterol a una razón molar de 28.5%; y DOPE a una

razón molar de 30%.

En ciertas realizaciones, la NPL comprende: GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 a una razón molar de 40%; DMG-PEG2000 a una razón molar de 1.5%; colesterol a una razón molar de 28.5%; y DOPE a una razón molar de 30%.

5 En ciertas realizaciones, la NPL comprende: 8-[(2-hidroxietil)[6-oxo-6-(undeciloxi)hexil]amino]octanoato de 9-heptadecanilo (SM-102) a una razón molar de 50%; 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC) a una razón molar de 10%; colesterol a una razón molar de 38.5%; y 1,2-dimiristoil-rac-glicero-3-metoxipolietilenglicol-2000 (DMG-PEG2000) a una razón molar del 1.5%.

10 En ciertas realizaciones, la NPL comprende: bis(2-hexildecanoato) de (4-hidroxibutil)azanodiil]di(hexano-6,1-diilo) (ALC-0315) a una razón molar de 46.3%; 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC) a una razón molar de 9.4%; colesterol a una razón molar de 42.7%; y 2-[(polietilenglicol)-2000]-N,N-ditetradecilacetamida (ALC-0159) a una razón molar de 1.6%.

15 En ciertas realizaciones, la NPL comprende: bis(2-hexildecanoato) de (4-hidroxibutil)azanodiil]di(hexano-6,1-diilo) (ALC-0315) a una razón molar de 47.4%; 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC) a una razón molar de 10%; colesterol a una razón molar de 40.9%; y 2-[(polietilenglicol)-2000]-N,N-ditetradecilacetamida (ALC-0159) a una razón molar de 1.7%.

Para calcular la cantidad real de cada lípido que se va a poner en una formulación de NPL, se determina primero la cantidad molar del lípido catiónico basándose en una razón N/P deseada, donde N es el número de átomos de nitrógeno en el lípido catiónico y P es el número de grupos fosfato en el ARNm que va a ser transportado por la NPL. A continuación, se calcula la cantidad molar de cada uno de los otros lípidos en función de la cantidad molar del lípido catiónico y de la razón molar seleccionada. Estas cantidades molares se convierten en pesos utilizando el peso molecular de cada lípido.

F. Tampón y otros componentes

25 Para estabilizar el ácido nucleico y/o las NPL (p. ej., para prolongar la vida útil del producto de la vacuna), para facilitar la administración de la composición farmacéutica de la NPL, y/o para mejorar la expresión *in vivo* del ácido nucleico, el ácido nucleico y/o la NPL pueden formularse combinados con uno o más portadores, ligandos de direccionamiento, reactivos estabilizadores (p. ej., conservantes y antioxidantes), y/u otros excipientes farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de tales excipientes son parabenos, timerosal, tiomersal, clorobutanol, cloruro de benzalconio y quelantes (p. ej., EDTA).

30 Las composiciones de NPL de la presente divulgación pueden proporcionarse en forma líquida congelada o en forma liofilizada. Se puede utilizar una variedad de crioprotectores, incluyendo, sin limitación, sacarosa, trehalosa, glucosa, manitol, manosa, dextrosa, y similares. El crioprotector puede constituir 5-30% (p/v) de la composición de NPL. En algunas realizaciones, la composición de NPL comprende trehalosa, p. ej., al 5-30% (p. ej., 10%) (p/v). Una vez formuladas con el crioprotector, las composiciones de NPL pueden ser congeladas (o liofilizadas y criopreservadas) de -20 °C a -80 °C.

Las composiciones de NPL pueden suministrarse a un paciente en una solución acuosa tamponada, descongelada si se ha congelado previamente, o si se ha liofilizado previamente,

reconstituida en una solución acuosa tamponada junto a la cama. La solución tamponada puede ser isotónica y adecuada, p. ej., para la inyección intramuscular o intradérmica. En algunas realizaciones, la solución tamponada es una solución salina tamponada con fosfato (PBS).

VI. Procedimientos de fabricación de vacunas de NPL

5 Las presentes NPL pueden prepararse mediante diversas técnicas. Por ejemplo, las vesículas multilamelares (VML) pueden prepararse según técnicas convencionales, tal como depositando un lípido seleccionado en la pared interior de un recipiente o contenedor adecuado, disolviendo el lípido en un disolvente apropiado y evaporando después el disolvente para dejar una película fina en el interior del
10 recipiente o mediante secado por pulverización. A continuación, se puede añadir una fase acuosa al recipiente con un movimiento de vórtice que da lugar a la formación de VML. Después, pueden formarse vesículas unilamelares (VUL) mediante homogeneización, sonicación o extrusión de las vesículas multilamelares. Además, se pueden formar vesículas unilamelares mediante técnicas de eliminación de detergentes.

En las Publicaciones de Estados Unidos Núm. 2011/0244026, US 2016/0038432, US
15 2018/0153822, US 2018/0125989 y US 2021/0046192 se describen varios métodos que pueden utilizarse para fabricar vacunas de NPL. Un procedimiento ilustrativo implica encapsular ARNm mezclándolo con una mezcla de lípidos, sin preformar los lípidos en nanopartículas lipídicas, como se describe en la Publicación de Estados Unidos Núm. US 2016/0038432. Otro procedimiento ilustrativo implica encapsular ARNm mezclando NPL preformadas con ARNm, como se describe en la Publicación de Estados Unidos
20 Núm. US 2018/0153822.

En algunas realizaciones, el procedimiento de preparación de las NPL cargadas con ARNm incluye una etapa de calentamiento de una o más de las soluciones a una temperatura superior a la temperatura ambiente, siendo las una o más soluciones la solución que comprende las nanopartículas lipídicas preformadas, la solución que comprende el ARNm y la solución mezclada que comprende el
25 ARNm encapsulado en la NPL. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye la etapa de calentar una o ambas soluciones de ARNm y la solución de NPL preformada antes de la etapa de mezclado. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye calentar una o más de las soluciones que comprenden las NPL preformadas, la solución que comprende el ARNm y la solución que comprende el ARNm encapsulado en NPL durante la etapa de mezclado. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye la
30 etapa de calentar el ARNm encapsulado en NPL después de la etapa de mezclado. En algunas realizaciones, la temperatura a la que se calientan las una o más soluciones es o es mayor que aproximadamente 30°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C o 70°C. En algunas realizaciones, la temperatura a la que se calientan las una o más soluciones oscila entre aproximadamente 25-70°C, aproximadamente 30-70°C, aproximadamente 35-70°C, aproximadamente 40-70°C, aproximadamente
35 45-70°C, aproximadamente 50-70°C, o aproximadamente 60-70°C. En algunas realizaciones, la temperatura es de aproximadamente 65°C.

Pueden utilizarse varios métodos para preparar una solución de ARNm adecuada para la presente divulgación. En algunas realizaciones, el ARNm puede disolverse directamente en una solución

tampón descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, una solución de ARNm puede generarse mezclando una solución de partida de ARNm con una solución tampón antes de mezclarla con una solución lipídica para la encapsulación. En algunas realizaciones, una solución de ARNm puede generarse mezclando una solución de partida de ARNm con una solución tampón inmediatamente antes de mezclarla con una solución lipídica para su encapsulación. En algunas realizaciones, una solución de partida de ARNm adecuada puede contener ARNm en agua o en un tampón a una concentración igual o superior a aproximadamente 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.8 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.2 mg/ml, 1.4 mg/ml, 1.5 mg/ml o 1.6 mg/ml, 2.0 mg/ml, 2.5 mg/ml, 3.0 mg/ml, 3.5 mg/ml, 4.0 mg/ml, 4.5 mg/ml o 5.0 mg/ml.

En algunas realizaciones, una solución de partida de ARNm se mezcla con una solución tampón utilizando una bomba. Las bombas ilustrativas incluyen, pero sin limitarse a, bombas de engranajes, bombas peristálticas y bombas centrífugas. Típicamente, la solución tampón se mezcla a una velocidad mayor que la de la solución de partida de ARNm. Por ejemplo, la solución tampón puede mezclarse a una velocidad de al menos 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 15x o 20x mayor que la velocidad de la solución de partida de ARNm. En algunas realizaciones, una solución tampón se mezcla a una velocidad de flujo que oscila entre aproximadamente 100-6000 ml/minuto (p. ej., aproximadamente 100-300 ml/minuto, 300-600 ml/minuto, 600-1200 ml/minuto, 1200-2400 ml/minuto, 2400-3600 ml/minuto, 3600-4800 ml/minuto, 4800-6000 ml/minuto, o 60-420 ml/minuto). En algunas realizaciones, una solución tampón se mezcla a una velocidad de flujo de, o mayor que, aproximadamente 60 ml/minuto, 100 ml/minuto, 140 ml/minuto, 180 ml/minuto, 220 ml/minuto, 260 ml/minuto, 300 ml/minuto, 340 ml/minuto, 380 ml/minuto, 420 ml/minuto, 480 ml/minuto, 540 ml/minuto, 600 ml/minuto, 1200 ml/minuto, 2400 ml/minuto, 3600 ml/minuto, 4800 ml/minuto, o 6000 ml/minuto.

En algunas realizaciones, una solución de partida de ARNm se mezcla a una velocidad de flujo que oscila entre aproximadamente 10-600 ml/minuto (p. ej., aproximadamente 5-50 ml/minuto, aproximadamente 10-30 ml/minuto, aproximadamente 30-60 ml/minuto, aproximadamente 60-120 ml/minuto, aproximadamente 120-240 ml/minuto, aproximadamente 240-360 ml/minuto, aproximadamente 360-480 ml/minuto, o aproximadamente 480-600 ml/minuto). En algunas realizaciones, una solución de partida de ARNm se mezcla a una velocidad de flujo de o superior a aproximadamente 5 ml/minuto, 10 ml/minuto, 15 ml/minuto, 20 ml/minuto, 25 ml/minuto, 30 ml/minuto, 35 ml/minuto, 40 ml/minuto, 45 ml/minuto, 50 ml/minuto, 60 ml/minuto, 80 ml/minuto, 100 ml/minuto, 200 ml/minuto, 300 ml/minuto, 400 ml/minuto, 500 ml/minuto o 600 ml/minuto.

El procedimiento de incorporación de un ARNm deseado a una nanopartícula lipídica se denomina "carga". Los métodos ilustrativos son descritos por Lasic et al., *FEBS Lett.* (1992) 312:255-8. Los ácidos nucleicos incorporados a la NPL pueden estar total o parcialmente localizados en el espacio interior de la nanopartícula lipídica, dentro de la membrana bicapa de la nanopartícula lipídica, o asociados a la superficie exterior de la membrana de la nanopartícula lipídica. La incorporación de un ARNm a nanopartículas lipídicas también se denomina en el presente documento "encapsulación", en donde el ácido nucleico está total o sustancialmente contenido en el espacio interior de la nanopartícula

lipídica.

Las NPL adecuadas pueden fabricarse en varios tamaños. En algunas realizaciones, la disminución del tamaño de las nanopartículas lipídicas se asocia con un suministro más eficiente de un ARNm. La selección de un tamaño de NPL adecuado puede tener en cuenta el lugar de la célula o tejido diana y, en cierta medida, la aplicación para la que se está fabricando la nanopartícula lipídica.

Existe una variedad de métodos para medir el tamaño de una población de nanopartículas lipídicas. En diversas realizaciones, los métodos del presente documento utilizan Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical) para medir el tamaño de las partículas de NPL. En un protocolo, se mezclan 10 µl de una muestra de NPL con 990 µl de trehalosa al 10%. Esta solución se carga en una cubeta y a continuación, se introduce en la máquina Zetasizer. El diámetro medio z (nm), o la media de los cumulant, se considera el tamaño medio de las NPL en la muestra. La máquina Zetasizer también puede utilizarse para medir el índice de polidispersidad (PDI) utilizando la dispersión de luz dinámica (DLS) y el análisis de cumulant de la función de autocorrelación. El diámetro medio de la NPL puede reducirse mediante sonicación de la NPL formada. Los ciclos de sonicación intermitentes pueden alternarse con la evaluación de la dispersión de luz cuasi-elástica (QELS) para guiar la síntesis eficiente de nanopartículas lipídicas.

En algunas realizaciones, la mayoría de las NPL purificadas, es decir, más de aproximadamente 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las NPL, tienen un tamaño de aproximadamente 70-150 nm (p. ej., aproximadamente 145 nm, aproximadamente 140 nm, aproximadamente 135 nm, aproximadamente 130 nm, aproximadamente 125 nm, aproximadamente 120 nm, aproximadamente 115 nm, aproximadamente 110 nm, aproximadamente 105 nm, aproximadamente 100 nm, aproximadamente 95 nm, aproximadamente 90 nm, aproximadamente 85 nm, o aproximadamente 80 nm). En algunas realizaciones, prácticamente todas (p. ej., más de 80% o 90%) las nanopartículas lipídicas purificadas tienen un tamaño de aproximadamente 70-150 nm (p. ej., aproximadamente 145 nm, aproximadamente 140 nm, aproximadamente 135 nm, aproximadamente 130 nm, aproximadamente 125 nm, aproximadamente 120 nm, aproximadamente 115 nm, aproximadamente 110 nm, aproximadamente 105 nm, aproximadamente 100 nm, aproximadamente 95 nm, aproximadamente 90 nm, aproximadamente 85 nm o aproximadamente 80 nm).

En ciertas realizaciones, la NPL tiene un diámetro medio de 30-200 nm.

En diversas realizaciones, la NPL tiene un diámetro medio de 80-150 nm.

En algunas realizaciones, las NPL de la presente composición tienen un tamaño medio inferior a 150 nm, inferior a 120 nm, inferior a 100 nm, inferior a 90 nm, inferior a 80 nm, inferior a 70 nm, inferior a 60 nm, inferior a 50 nm, inferior a 30 nm o inferior a 20 nm.

En algunas realizaciones, más de aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las NPL de la presente composición tienen un tamaño que oscila entre aproximadamente 40-90 nm (p. ej., aproximadamente 45-85 nm, aproximadamente 50-80 nm, aproximadamente 55-75 nm o aproximadamente 60-70 nm) o aproximadamente 50-70 nm (p. ej., aproximadamente 55-65 nm) son adecuadas para el suministro pulmonar mediante nebulización.

En algunas realizaciones, la dispersidad, o medida de heterogeneidad en el tamaño de las moléculas (PDI), de las NPL en una composición farmacéutica proporcionada por la presente divulgación es menor que aproximadamente 0.5. En algunas realizaciones, una NPL tiene un PDI de menos de aproximadamente 0.5, menos de aproximadamente 0.4, menos de aproximadamente 0.3, menos de aproximadamente 0.28, menos de aproximadamente 0.25, menos de aproximadamente 0.23, menos de aproximadamente 0.20, menos de aproximadamente 0.18, menos de aproximadamente 0.16, menos de aproximadamente 0.14, menos de aproximadamente 0.12, menos de aproximadamente 0.10, o menos de aproximadamente 0.08. El PDI puede ser medido por una máquina Zetasizer como se ha descrito anteriormente.

En algunas realizaciones, más de aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de las NPL purificadas en una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento encapsulan un ARNm dentro de cada partícula individual. En algunas realizaciones, prácticamente todas (p. ej., más de 80% o 90%) de las nanopartículas lipídicas purificadas en una composición farmacéutica encapsulan un ARNm dentro de cada partícula individual. En algunas realizaciones, una nanopartícula lipídica tiene una eficiencia de encapsulación de 50% a 99%; o mayor que aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 98% o 99%. Típicamente, las nanopartículas lipídicas para su uso en el presente documento tienen una eficiencia de encapsulación de al menos 90% (p. ej., al menos 91%, 92%, 93%, 94% o 95%).

En algunas realizaciones, una NPL tiene una razón N/P de 1 a 10. En algunas realizaciones, una nanopartícula lipídica tiene una razón N/P superior a 1, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, o aproximadamente 8. En ciertas realizaciones, una NPL típica en el presente documento tiene una razón N/P de 4.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica según la presente divulgación contiene al menos aproximadamente 0.5 µg, 1 µg, 5 µg, 10 µg, 100 µg, 500 µg o 1000 µg de ARNm encapsulado. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica contiene aproximadamente de 0.1 µg a 1000 µg, al menos aproximadamente 0.5 µg, al menos aproximadamente 0.8 µg, al menos aproximadamente 1 µg, al menos aproximadamente 5 µg, al menos aproximadamente 8 µg, al menos aproximadamente 10 µg, al menos aproximadamente 50 µg, al menos aproximadamente 100 µg, al menos aproximadamente 500 µg, o al menos aproximadamente 1000 µg de ARNm encapsulado.

En algunas realizaciones, el ARNm puede prepararse mediante síntesis química o mediante transcripción *in vitro* (TIV) de un molde de ADN. En este procedimiento, un procedimiento de TIV, se utiliza un molde de ADNc para producir un transcrito de ARNm y el molde de ADN se degrada mediante una ADNasa. El transcrito se purifica mediante filtración en profundidad y filtración de flujo tangencial (TFF). El transcrito purificado se modifica adicionalmente añadiendo una protección terminal y una cola, y el ARN modificado se purifica de nuevo mediante filtración en profundidad y TFF.

A continuación, el ARNm se prepara en un tampón acuoso y se mezcla con una solución anfífila que contiene los componentes lipídicos de las NPL. Una solución anfífila para disolver los cuatro

componentes lipídicos de las NPL puede ser una solución de alcohol. En algunas realizaciones, el alcohol es etanol. El tampón acuoso puede ser, por ejemplo, un tampón de citrato, fosfato, acetato o succinato y puede tener un pH de aproximadamente 3.0-7.0, p. ej., aproximadamente 3.5, aproximadamente 4.0, aproximadamente 4.5, aproximadamente 5.0, aproximadamente 5.5, aproximadamente 6.0 o aproximadamente 6.5. El tampón puede contener otros componentes tales como una sal (p. ej., sales de sodio, potasio y/o calcio). En realizaciones particulares, el tampón acuoso tiene citrato 1 mM, NaCl 150 mM, pH 4.5.

Un procedimiento ilustrativo, no limitante, para preparar una composición de ARNm-NPL implica mezclar una solución tamponada de ARNm con una solución de lípidos en etanol de forma homogénea controlada, donde la razón de lípidos:ARNm se mantiene durante todo el procedimiento de mezclado. En este ejemplo ilustrativo, el ARNm se presenta en un tampón acuoso que contiene ácido cítrico monohidratado, citrato trisódico dihidratado y cloruro sódico. La solución de ARNm se añade a la solución (tampón de citrato 1 mM, NaCl 150 mM, pH 4.5). La mezcla lipídica de cuatro lípidos (p. ej., un lípido catiónico, un lípido PEGilado, un lípido basado en colesterol y un lípido auxiliar) se disuelve en etanol. La solución acuosa de ARNm y la solución lipídica de etanol se mezclan a una razón en volumen de 4:1 en un mezclador en "T" con un sistema de bomba casi "sin pulso". La mezcla resultante se somete a continuación a una purificación posterior y a un intercambio de tampón. El intercambio de tampón puede realizarse mediante casetes de diálisis o un sistema TFF. La TFF puede utilizarse para concentrar e intercambiar el tampón de la NPL naciente resultante inmediatamente después de su formación mediante el procedimiento con mezcladora en T. El procedimiento de diafiltración es una operación continua, que mantiene el volumen constante mediante la adición del tampón adecuado al mismo ritmo que fluye el permeato.

VII. Envasado y uso de la vacuna contra hMPV

Uno o más antígenos del polipéptido F de hMPV descritos en el presente documento pueden administrarse a un sujeto como vacuna. Las vacunas contra el hMPV descritas en el presente documento pueden formularse o envasarse para su administración parenteral (p. ej., intramuscular, intradérmica o subcutánea) o nasofaríngea (p. ej., intranasal). En diversas realizaciones, las vacunas contra hMPV pueden formularse o envasarse para su administración pulmonar. En diversas realizaciones, las vacunas contra hMPV pueden formularse o envasarse para su administración intravenosa. Las composiciones de vacunas pueden estar en forma de una formulación extemporánea, donde la composición se liofiliza y se reconstituye con un tampón fisiológico (p. ej., PBS) justo antes de su uso. Las composiciones de vacunas también pueden enviarse y suministrarse en forma de solución acuosa o solución acuosa congelada y pueden administrarse directamente a los sujetos sin reconstitución (después de la descongelación, si se ha congelado previamente).

En consecuencia, la presente divulgación proporciona un artículo de fabricación, tal como un kit, que proporciona la vacuna contra hMPV en un solo recipiente o proporciona la vacuna contra hMPV en un recipiente (p. ej., un primer recipiente) y un tampón fisiológico para la reconstitución en otro recipiente (p. ej., un segundo recipiente). El recipiente o los recipientes pueden contener una dosis de un solo uso o

una dosis de varios usos. El recipiente o los recipientes pueden ser viales o ampollas de vidrio pretratados. El artículo de fabricación puede incluir también instrucciones de uso.

Los métodos de administración de una vacuna contra hMPV incluyen, pero sin limitarse a, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, intratraqueal, epidural y oral. La composición puede administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, rectal e intestinal, etc.) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos.

En realizaciones particularmente ilustrativas, la vacuna se administra por vía intramuscular (IM) mediante una inyección. La vacuna contra hMPV puede inyectarse en un sujeto en, por ejemplo, su músculo deltoide en la parte superior del brazo. En tales realizaciones, los inyectables se preparan en formas convencionales, es decir, como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. En algunas realizaciones, las soluciones y suspensiones inyectables se preparan a partir de polvos estériles, polvos liofilizados o gránulos.

Una composición farmacéutica descrita en el presente documento puede suministrarse, p. ej., por vía intramuscular, subcutánea o intravenosa, con una aguja y jeringa estándar, que opcionalmente está precargada. Además, un dispositivo de suministro tipo pluma (p. ej., un inyector (p. ej., de una o varias cámaras) o una pluma autoinyectora) tiene aplicaciones en el suministro de una composición farmacéutica descrita en el presente documento. Tal dispositivo de suministro tipo pluma puede ser reutilizable o desechable. En algunas realizaciones, la vacuna se proporciona para su uso en inhalación y se proporciona en una bomba precargada, un aerosolizador o un inhalador. En ciertas realizaciones, se puede utilizar una jeringa precargada para la administración en forma de gotas para suministro intranasal.

Las vacunas contra hMPV pueden administrarse a los sujetos que las necesiten en una cantidad profilácticamente eficaz, es decir, una cantidad que proporcione suficiente protección inmunitaria contra un patógeno diana durante un periodo de tiempo suficiente (p. ej., un año, dos años, cinco años, diez años o toda la vida). La protección inmunitaria suficiente puede ser, por ejemplo, la prevención o el alivio de los síntomas asociados a las infecciones por el patógeno. En algunas realizaciones, se administran múltiples dosis (p. ej., dos dosis) de la vacuna (p. ej., se inyectan) a los sujetos que la necesitan para lograr los efectos profilácticos deseados. Las dosis (p. ej., la primera dosis y la de refuerzo) pueden estar separadas por un intervalo de al menos, p. ej., 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año, dos años, cinco años o diez años.

VIII. Composiciones farmacéuticas

Los antígenos del polipéptido de hMPV purificados según esta divulgación pueden ser útiles como componente de composiciones farmacéuticas, por ejemplo, para su uso como vacuna. Estas composiciones incluirán típicamente ARN o un polipeptido de unión y un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente divulgación también puede incluir uno o más componentes adicionales, tales como inmunopotenciadores de molécula pequeña (p. ej., agonistas de

TLR). Una composición farmacéutica de la presente divulgación también puede incluir un sistema de suministro para el ARN, tal como un liposoma, una emulsión de aceite en agua o una micropartícula. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una nanopartícula lipídica (NPL). En ciertas realizaciones, la composición comprende una molécula de ácido nucleico codificante de antígeno encapsulada dentro de una NPL.

Se proporcionan métodos que comprenden la administración de un polipéptido de unión a hMPV a un paciente, en los que el antagonista del polipéptido de unión a hMPV está contenido en una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se formulan con portadores, excipientes y otros agentes adecuados que proporcionan una transferencia, suministro, tolerancia y similares adecuados. Se puede encontrar una multitud de formulaciones apropiadas en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como LIPOFECTIN™), productos conjugados de ADN, pastas de absorción anhidra, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones carbowax (polietilenglicoles de varios pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Véase también Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol. 52:238-311.

Se conocen varios sistemas de suministro que pueden utilizarse para administrar las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, p. ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptores (véase, por ejemplo, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Los métodos de administración incluyen, pero sin limitarse a, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, intratraqueal, epidural y oral. La composición puede administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, rectal e intestinal, etc.) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos.

Una composición farmacéutica descrita en el presente documento puede suministrarse por vía subcutánea o intravenosa con una aguja y jeringa estándar (p. ej., una jeringa precargada). Además, con respecto al suministro subcutáneo, un dispositivo de suministro tipo pluma (p. ej., una pluma autoinyectora) tiene fácilmente aplicaciones en el suministro de una composición farmacéutica descrita en el presente documento.

Para la administración directa a los senos paranasales, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse utilizando, p. ej., un microcatéter (p. ej., un endoscopio y un microcatéter), un aerosolizador, un dispensador de polvo, un nebulizador o un inhalador. Los métodos incluyen la administración de un polipéptido de unión a hMPV a un sujeto que lo necesite en una formulación aerosolizada. Los anticuerpos aerosolizados pueden prepararse como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Núm. US 8.178.098, incorporada al presente documento como referencia en su totalidad.

Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación para inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse por métodos conocidos. Por ejemplo, las preparaciones inyectables pueden prepararse, p. ej., disolviendo, suspendiendo o emulsionando el anticuerpo o su sal descritos anteriormente en un medio acuoso estéril o un medio oleoso utilizado convencionalmente para las inyectables. Como medio acuoso para inyectables, existen, por ejemplo, la solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes auxiliares, etc., que pueden utilizarse combinados con un agente solubilizante apropiado, tal como un alcohol (p. ej., etanol), un polialcohol (p. ej., propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico (p. ej., polisorbato 80, HCO-50 [aducto de polioxietileno (50 moles) de aceite de ricino hidrogenado]), etc. Como medio oleoso, se emplean, p. ej., aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que pueden utilizarse combinados con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo, alcohol bencílico, etc. El inyectable así preparado se carga típicamente en una ampolla adecuada.

Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas de dosificación en una dosis unitaria adecuada para ajustar una dosis de los ingredientes activos. Tales formas de dosificación en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyectables (ampollas), supositorios, etc.

IX. Métodos de vacunación

La vacuna contra el hMPV divulgada en el presente documento puede administrarse a un sujeto para inducir una respuesta inmunitaria dirigida contra la proteína F de hMPV, en donde el título de anticuerpos antiantígeno en el sujeto aumenta tras la vacunación con relación al título de anticuerpos antiantígeno en un sujeto que no se vacuna con la vacuna contra el hMPV divulgada en el presente documento, o con relación a una vacuna alternativa contra el hMPV. Un "anticuerpo antiantígeno" es un anticuerpo sérico que se une específicamente al antígeno.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria al hMPV o para proteger a un sujeto contra la infección por hMPV que comprende la administración de la vacuna contra hMPV descrita en el presente documento a un sujeto. La divulgación también proporciona una vacuna contra hMPV descrita en el presente documento para su uso en la obtención de una respuesta inmunitaria contra hMPV o en la protección de un sujeto contra la infección por hMPV. La divulgación también proporciona un ARNm de hMPV descrito en el presente documento para su uso en la fabricación de una vacuna para provocar una respuesta inmunitaria al hMPV o para proteger a un sujeto contra la infección por hMPV.

En ciertas realizaciones, el sujeto tiene una concentración sérica de anticuerpos neutralizantes contra el hMPV comparable tras la administración de la vacuna contra hMPV, con relación a un sujeto al que se le administra una vacuna proteica contra hMPV que se coadministra junto con un adyuvante.

En ciertas realizaciones, la vacuna contra hMPV aumenta la concentración sérica de anticuerpos con especificidad de unión al sitio Ø de la proteína F de hMPV.

En ciertas realizaciones, la vacuna contra hMPV aumenta la concentración sérica de anticuerpos

con especificidad de unión al sitio V de la proteína F de hMPV.

En ciertas realizaciones, la vacuna contra el hMPV aumenta la concentración sérica de anticuerpos neutralizantes en un sujeto con inmunidad preexistente al hMPV.

Para que esta invención pueda entenderse mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son sólo para fines de ilustración y no deben interpretarse como una limitación del alcance de la invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

La descripción anterior de las realizaciones específicas revelará tan completamente la naturaleza general de la divulgación que otros pueden, aplicando conocimientos dentro de la habilidad de la técnica, modificar y/o adaptar fácilmente para varias aplicaciones tales realizaciones específicas, sin experimentación indebida, sin apartarse del concepto general de la presente divulgación. Por lo tanto, tales adaptaciones y modificaciones están destinadas a estar dentro del significado y el rango de equivalencias de las realizaciones divulgadas, basadas en la enseñanza y la orientación presentadas en el presente documento. Debe entenderse que la fraseología o la terminología que se utilizan en el presente documento es a efectos de descripción y no de limitación, de modo que la terminología o la fraseología de la presente memoria descriptiva deben ser interpretadas por el experto en la técnica a la luz de las enseñanzas y la orientación.

Ejemplo 1: Generación de las construcciones de antígenos de la glicoproteína F de hMPV estabilizadas antes de la fusión

Para mejorar la estabilidad de la conformación de prefusión, mejorar la purificación e inducir títulos más altos de anticuerpos neutralizantes, se diseñó un panel de construcciones de antígeno F de prefusión de hMPV candidatas con mutaciones en el antígeno F de hMPV de tipo salvaje basándose en el subtipo A2 de Canadá designado A2-CAN97-83 (SEQ ID NO: 1).

En la **FIG. 1** se muestra una representación gráfica de las consideraciones de diseño para el panel de construcciones de antígeno F de prefusión de hMPV candidatas para dos construcciones ilustrativas, D185P (SEQ ID NO: 5) y T160F/N46V (SEQ ID NO: 7). Cada construcción contenía las siguientes características: (1) péptido señal; (2) mutaciones en el sitio de escisión pre-F en el aminoácido 100-101 (QS a RR); (3) eliminación del dominio transmembrana y de la cola citoplásmica; (4) adición de un motivo fibritina (es decir, un dominio foldón); (5) sitio de escisión RVH-3C; (6) etiqueta His 8x y etiquetas Strep II; y (7) conectores adecuados para los puntos (4) a (6) (SEQ ID NO: 3).

A partir de esta cadena principal, se realizó un análisis *in silico* para determinar mutaciones de uno o dos puntos que aumentarían la estabilidad de la conformación pre-F añadiendo mutaciones de cavidad de llenado o mutaciones de estabilidad de interfaz. En total, el panel de antígenos F de prefusión de hMPV candidatos estaba compuesto por 21 construcciones diferentes, como se muestra en la columna 1 de la **Tabla 1**.

Ejemplo 2: Evaluación de la expresión de la proteína para las construcciones de antígeno F de hMPV estabilizadas antes de la fusión

Se aisló la molécula de ácido nucleico de cada una de las construcciones de antígeno F de

prefusión de hMPV candidatas y se clonó en un vector de expresión. La producción de la expresión proteica de cada construcción se evaluó tras la transfección transitoria en mamíferos utilizando células humanas Expi293F. Veinticuatro horas después de la transfección de las construcciones, se recuperaron los productos lisados celulares o sobrenadantes para su análisis mediante transferencia western.

De los 21 diseños candidatos, se produjeron nueve antígenos proteicos. Sin embargo, sólo cuatro antígenos proteicos tenían una pureza $\geq 90\%$, determinada por SDS-PAGE a partir de un cultivo de 1L. Las características de expresión de la proteína para todas las 21 construcciones se muestran en la **Tabla 1**. Las construcciones que tenían una alta producción de proteínas y pureza tenían las siguientes mutaciones: D185P, T160F_N46V, K138F y G366F_K362F.

Tabla 1 - Características de la expresión proteica de las 21 construcciones de antígeno F de prefusión de hMPV candidatas

Núm. ID	Mutaciones simples o dobles	1 ^{er} cultivo	Pureza por SDS-PAGE
1	D185P	Alta	> 95 %
2	G366F_K362Y	N/D	
3	K126F_E431A	N/D	
4	D87F_E327F	N/D	
5	R253F_E327F	N/D	
6	Y425F_A116Y	Baja	> 70 %
7	Q426F_T119F	Baja	> 75 %
8	T160F_N46V	Alta	> 95 %
9	K166F_E51F	N/D	
10	E327F_R329F	N/D	
11	R304K_D306W	N/D	
12	T160F_T49Y	N/D	
13	K126A	N/D	
14	K138F	Alta	> 90 %
15	T83F_K75F	N/D	
16	K362L_D454E	Baja	> 75 %
17	E305F	N/D	
18	A159F	Baja	> 60 %
19	G366F_K362F	Alta	> 95 %
20	G366D	Baja	> 40 %
21	K126F_E431F	N/D	

Ejemplo 3: Inmunogenicidad de las construcciones de proteína del antígeno F de hMPV estabilizadas antes de la fusión en ratones

Las cuatro construcciones de antígeno F de hMPV candidatas con una pureza de $\geq 90\%$ descritas en la Tabla 1 fueron posteriormente evaluadas en cuanto a su inmunogenicidad en ratones en comparación con la proteína F de hMPV de referencia de una cepa A1.

A grupos de 8 ratones BALB/c (N=8), como se muestra en la **Tabla 2**, se les administró una dosis de 0.5 μg de antígeno proteico adyuvado con hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) mediante inyección intramuscular (IM) el día (D) 0 y D21. Se tomaron muestras de sangre de todos los ratones y se extrajo el suero antes de cada administración de la vacuna, así como dos semanas después de la última vacunación (D35). A continuación, se utilizó el suero para determinar los títulos de IgG anti-F de hMPV circulantes, medidos mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (**FIG. 2**) y mediante un ensayo de microneutralización de hMPV (**FIG. 3**) para determinar la actividad neutralizadora de las respuestas de anticuerpos. Para garantizar que todas las proteínas del grupo post-F estuvieran realmente en la conformación post-F, las proteínas se calentaron a 70°C durante 10 minutos antes de su preparación para la administración.

Tabla 2 - Diseño del estudio de la vacuna de antígeno F de hMPV en ratones

Grupo	Número de ratones	Antígeno proteico más adyuvante (alumbre)	Dosis (μg)	Administración	Fundamento
1	8	hMPV A2-F D185P	0.5	50 μl por pata (100 μl en total)	Construcción de prueba
2	8	hMPV A2-F T160F_N46V	0.5	50 μl por pata (100 μl en total)	Construcción de prueba
3	8	hMPV A2-F K138F	0.5	50 μl por pata (100 μl en total)	Construcción de prueba
4	8	hMPV A2-F G366F_K362F	0.5	50 μl por pata (100 μl en total)	Construcción de prueba
5	8	hMPV A1 pre-F lote 1	0.5	50 μl por pata (100 μl en total)	Referencia A1 pre-F
6	8	hMPV A1 pre-F lote 2	0.5	50 μl por pata (100 μl en total)	Referencia A1 pre-F
7	8	hMPV A1 post-F (tratado térmicamente)	0.5	50 μl por pata (100 μl en total)	Referencia A1 post-F
8	8	hMPV B2 pre-F	0.5	50 μl por pata (100 μl en total)	Referencia B2 pre-F

Los datos muestran que la construcción con la mutación A2-K138F indujo el mayor título de anticuerpos de unión por ELISA de F de hMPV, seguido de A2-T160F_N46V, A2-G366F_K362F y, finalmente, A2-D185P (**FIG. 2**). Cuando se evaluó por microneutralización utilizando un virus hMPV A2-GFP, A2-T160F_N46V tuvo el título de neutralización más alto, seguido de A2-K138F, A2-D185P y A2-

G366F_K362F (**FIG. 3**).

Aunque A2-K138F tenía el título más alto de anticuerpos de unión y el segundo título más alto de anticuerpos neutralizantes, se descubrió que esta construcción formaba agregados en solución, lo que indicaba un posible plegamiento incorrecto de la proteína, y por lo tanto se eliminó de la evaluación posterior. A2-G366F_K362F también fue eliminado de la evaluación posterior ya que tenía el segundo título de anticuerpos de unión más bajo y el título de anticuerpos neutralizantes más bajo. Por lo tanto, se descubrió que A2-D185P y A2-T160F_N46V inducían los anticuerpos de mayor calidad, y se eligieron para el análisis analítico avanzado para evaluar la pureza, el tamaño y la estabilidad térmica, como se describe en el Ejemplo 4.

Ejemplo 4: Caracterización fisicoquímica de las construcciones de antígeno F de hMPV estabilizadas antes de la fusión

Para caracterizar mejor la pureza, el tamaño y la estabilidad térmica de la proteína producida a partir de las construcciones A2-D185P y A2-T160F_N46V, se realizaron análisis HP-SEC, SEC-HPLC, SEC-MALS y nanoDSF.

Pureza y tamaño

Los resultados de los análisis HP-SEC, SEC-HPLC y SEC-MALS se resumen en la **Tabla 3**.

Tabla 3 - Resumen de las evaluaciones SEC para las construcciones de antígeno F de hMPV estabilizado pre-fusión y controles.

	A1 A185P	A1 Post-F	A2 T160F_N46V	A2 D185P
Trímero HP-SEC (%)	98.8	100	94.7	97.1
SEC-HPLC MW (kDa)	341.4	337.2	384.0	321.7
SEC-MALS MW (KDa)	224.4	282.5	266.5	224.3

Se determinó el peso molecular (MW) de MALS para el pico del trímero. Las condiciones para la SEC-HPLC fueron las siguientes: Columna SEC TSK 3000SWxl, tampón de fosfato (NaH_2PO_4 0.2M, Arginina 0.1M, IPA al 1%, pH 6.5), velocidad de flujo 0.5 ml/min. Las condiciones para SEC-MALS fueron las siguientes: Columna de Proteína BEH de 1.7 μM , 200 Å y tampón Tris 50 mM a pH 7.5, velocidad de flujo 0.3 ml/min.

La **FIG. 4** muestra los resultados de SEC-MALS para las proteínas A1 de referencia, A1-A185P y A1-post-F, y debajo, los candidatos a antígeno proteico A2, A2-T160F_N46V y A2-D185P. Los datos de las cuatro proteínas también se resumen en la **Tabla 3**. Ambas proteínas de referencia A1 muestran $\geq 98.8\%$ de formación de trímero y un MW de 224 y 283 kDa para A1-A185P y A1-post-F, respectivamente. La proteína de las construcciones A2-T160F_N46V y A2-D185P estaba compuesta por 97.4% y 97.1% de trímero con un MW de 267 y 224 kDa, respectivamente.

Estabilidad térmica

Se determinaron las temperaturas de inicio (Tonset) y los puntos de fusión (T_m) de la desnaturalización de las proteínas mediante fluorimetría de barrido diferencial a nanoescala (nanoDSF)

en lotes grandes y pequeños de proteínas A1-pre-F y A1-post-F, así como en los antígenos proteicos candidatos A2, A2-T160F_N46V y A2-D185P. Las muestras se diluyeron en tampón de formulación hasta una concentración final de 0.5 mg/ml y se cargaron en capilares nanoDSF por duplicado. Todas las mediciones se realizaron con un dispositivo nanoDSF. La velocidad de calentamiento fue de 1.5 °C por minuto, de 20°C a 95°C. Los datos se registraron y analizaron utilizando PR.Stability Analysis v1.01.

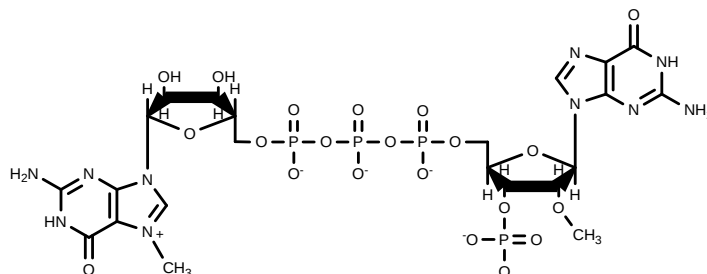
La **FIG. 5** muestra las curvas de fusión de A1-preF (A185P) y A2-postF (n=3), con valores de T_m de 60.12°C y 86.7°C, respectivamente. Estos datos muestran que nanoDSF pudo diferenciar entre los antígenos A1 pre- y post-fusión, con una diferencia de aproximadamente 27°C en la temperatura de fusión.

Curiosamente, al comparar las propiedades de termoestabilidad de los antígenos proteicos candidatos a F de hMPV A2, como se observa en la **FIG. 6**, se encontró que la proteína derivada de la construcción A2-T160F_N46V era más termoestable que la proteína más mínimamente modificada mediante ingeniería genética producida a partir de la construcción A2-D185P, con un aumento del punto de fusión de casi 9°C (T_m 70.4°C y 79.3°C, respectivamente).

Ejemplo 5: ARNm que codifica construcciones de antígeno F de hMPV estabilizadas de prefusión

Para determinar si la inmunogenicidad de las construcciones de antígeno F de hMPV podría mejorarse adicionalmente, se seleccionaron las construcciones A2-D185P y A2-T160F_N46V para probarlas en una vacuna basada en ARNm. Las secuencias de aminoácidos de las construcciones A2-D185P y A2-T160F_N46V se exponen en SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 11, respectivamente. Los ORF de ARNm para las construcciones A2-D185P y A2-T160F_N46V se exponen en SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8, respectivamente. Los ORF de los ARNm con codones optimizados para las construcciones A2-D185P y A2-T160F_N46V se establecen en SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, respectivamente.

Los ARNm descritos en el presente documento comprendían un marco de lectura abierto (ORF) que codificaba un antígeno proteico F del hMPV, al menos una región no traducida 5' (UTR 5'), al menos una región no traducida 3' (UTR 3'), y al menos una secuencia de poliadenilación (poli(A)). Los ARNm comprendían adicionalmente una protección terminal 5' con la siguiente estructura:



Las secuencias de ácido nucleico para la UTR 5' y la UTR 3' se citan en SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente.

Ejemplo 6: Inmunogenicidad de las construcciones de ARNm del antígeno F de hMPV estabilizadas de pre-fusión en ratones

La inmunogenicidad relativa de las construcciones A2-D185P y A2-T160F_N46V que expresaban ARNm se probó en ratones midiendo los títulos circulantes de anti-F de hMPV antes y después de la

inyección IM con ARNm formulado con una Nanopartícula Lipídica (NPL). Cada ARNm se encapsuló en una NPL compuesta por 40% de lípido catiónico OF-02, 30% de fosfolípido DOPE, 1.5% de lípido PEGilado DMGPEG2000 y 28.5% de colesterol. Alternativamente, los lípidos de la NPL pueden citarse en razones en las que lípido catiónico : lípido PEGilado : colesterol : fosfolípido es 40 : 1.5 : 28.5 : 30.

A grupos de ocho ratones BALB/c (N=8) se les administró con una dosis de 1 µg mediante inyección IM el D0 y el D21. Se tomaron muestras de sangre de todos los ratones y se extrajo suero antes de cada administración de la vacuna, así como dos semanas después de la última vacunación (D35). A continuación, se utilizó el suero para determinar los títulos de IgG anti- F de hMPV circulante, medidos mediante ELISA (**FIG. 7**) y mediante el ensayo de microneutralización de hMPV (**FIG. 8**) para determinar la actividad neutralizante de las respuestas de anticuerpos.

Tanto las construcciones A2-D185P como A2-T160F_N46V que expresaban ARNm indujeron títulos igualmente altos de anticuerpos de unión en todos los puntos de tiempo por ELISA para F de hMPV (**FIG. 7**). Cuando se evaluó mediante microneutralización utilizando un virus A2-GFP, ambas construcciones indujeron títulos de neutralización igualmente potentes (**FIG. 8**). Por lo tanto, ambos antígenos fueron igualmente inmunogénicos cuando se expresaron a través de ARNm-LNP.

Ejemplo 7: Diseño racional de una vacuna multipatógena de ARNm dirigida al hMPV y al VRS

El VRS y el hMPV son virus respiratorios que causan una amplia morbilidad en la población humana, sólo superada por el virus de la gripe (Collins et al. 2013, Fields Virology. 6 ed: Lippincott Williams and Wilkins). A pesar de la carga de la enfermedad, las estrategias vacunales y terapéuticas para ambos virus siguen siendo limitadas. Dada la homología sustancial entre las glicoproteínas de superficie del hMPV y del VRS, así como la consideración práctica de que la protección contra ambos virus daría lugar a menos inyecciones y simplificaría los calendarios de vacunación (Lauer et al. 2017, Clin Vaccine Immunol. 24(1):e00298-16), se diseñó una vacuna combinada de ARNm que comprendía las construcciones de antígeno del VRS y del hMPV.

En consecuencia, se coformuló una vacuna combinada que comprendía dos ARNm: (1) la construcción del antígeno F de VRS, FD3; y (2) la construcción del antígeno F de hMPV, A2-CAN97-83.

La construcción de ARNm de hMPV, así como las UTR 5' y 3' utilizadas se describen en el Ejemplo 6.

La construcción de ARNm de VRS utilizada se describe en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm. de Serie 63/276.233, que se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad a todos los efectos.

Ejemplo 8: Inmunogenicidad de la vacuna multipatógena de ARNm dirigida a hMPV y VRS en ratones

La inmunogenicidad relativa de la vacuna multipatógena de ARNm dirigida al hMPV y al VRS descrita en el Ejemplo 7 se evaluó en ratones midiendo los títulos circulantes anti-FD3 de VRS y anti-F de hMPV antes y después de la inyección IM con ARNm formulado con una nanopartícula lipídica (NPL). Cada ARNm se encapsuló en una NPL compuesta por 40% de lípido catiónico OF-02, 30% de fosfolípido DOPE, 1.5% de lípido PEGilado DMGPEG2000 y 28.5% de colesterol. Alternativamente, los lípidos de la NPL pueden citarse como razones en las que lípido catiónico : Lípido PEGilado : colesterol : fosfolípido

es 40 : 1.5 : 28.5 : 30.

Cinco grupos de ratones BALB/c (N=8) fueron inmunizados mediante inyección IM en D0 y D21 según los siguientes regímenes: (1) Grupo 1 - se administró una dosis de 1 µg de ARNm de VRS formulado con NPL cOrn-EE1 en 50 µl de volumen total administrado en la extremidad posterior derecha; (2) Grupo 2 - se administró una dosis de 1 µg de ARNm de hMPV formulado con NPL cOrn-EE1 en 50 µl de volumen total administrado en la extremidad posterior derecha; (3) Grupo 3 - se administró una coformulación que contenía 1 µg de VRS y 1 µg de ARNm de hMPV en una única NPL cOrn-EE1 en un volumen total de 100 µl, suministrando 50 µl a cada extremidad trasera; (4) Grupo 4 - se administró 1 µg de nanopartícula de proteína pre-F de VRS adyuvada con Alumbre en 50 µL de volumen total administrado a la extremidad posterior derecha como control de inmunogenicidad de VRS; y (5) Grupo 5 - se administró 1 µg de pre-F de hMPV adyuvado con Alumbre en 50 µL de volumen total administrado a la extremidad posterior derecha como control de inmunogenicidad de hMPV.

Se tomaron muestras de sangre de todos los ratones antes de cada administración de la vacuna, así como a las 2 semanas después de la última vacunación (D35), y los sueros D35 se analizaron mediante ELISA para determinar los títulos circulantes anti-VRS y anti-F de hMPV y mediante ensayos de microneutralización para determinar la actividad neutralizante de las respuestas de anticuerpos contra VRS y hMPV.

El ARNm de VRS indujo títulos similares mediante ELISA para F de VRS cuando se administró solo o cuando se coformuló con hMPV (**FIG. 9**). Del mismo modo, el ARNm de hMPV indujo títulos similares por ELISA para F de hMPV cuando se administró solo o cuando se coformuló con VRS (**FIG. 10**). Cuando se evaluó por microneutralización utilizando un virus VRS A2-GFP, se indujeron títulos de neutralización igualmente potentes por el ARNm de VRS suministrado solo o combinado con hMPV (**FIG. 11**). Cuando se evaluó la microneutralización utilizando un virus hMPV A2-GFP, se indujeron títulos de neutralización igualmente potentes con el ARNm de hMPV suministrado solo o combinado con VRS (**FIG. 12**). Por lo tanto, la inmunización con una coformulación ARNm de VRS y hMPV suministrada como una única NPL es similarmente inmunogénica a cualquiera de los dos antígenos suministrados solos.

Ejemplo 9: Análisis de la unión antígeno-anticuerpo del polipéptido F de hMPV

La unión de los anticuerpos a las construcciones de F de hMPV se probó en Octet. Todas las muestras y los anticuerpos se diluyeron en tampón cinético (tampón ForteBio Kinetic dilución 1X + PBS) a concentraciones finales de 5 µg/mL y 1 µg/mL, respectivamente. Los anticuerpos se cargaron en los biosensores de proteína A y la unión de todos los antígenos se probó con las siguientes condiciones: base de referencia inicial (120 s), carga de anticuerpo (180 s), segunda base de referencia (120 s), asociación del antígeno (180 s), disociación del antígeno (120 s). Los resultados de la unión se analizaron con el soporte lógico ForteBio Data Analysis 12.0.

La Tabla 4 muestra que A2-T160F_N46V y A2-D185P tenían los patrones de unión esperados para los mAb MPE8, 101F, 338 y DS7.

Tabla 4 - Características de unión de las construcciones antigénicas de F de hMPV

Anticuerpo	Sitio	A1 pre-F (A185P)	A1 post-F*	A2 pre-F (D185P)	A2 pre-F (T160F/N46V)
MPE8	III	+	-	+	+
101F	IV	+	+	+	+
338	II	+	+	+	+
DS7	I	+ (baja)	+	+ (baja)	+ (baja)

Ejemplo 10: Expresión del antígeno F de hMPV

Células HEK293 - 0.3 millones de células/pocillo

A continuación, las células HELA se sembraron en placas de 6 pocillos a 0.3 millones de células/pocillo en 2 mL de DMEM + FBS al 10%. Las células se transfectaron al día siguiente con construcciones de ARNm de hMPV de 1 µg/pocillo con lipofectamina 2000. Las células se cosecharon al día siguiente y se lisaron en 500 µl por pocillo de RIPA +1x HALT + Omnicleave al 0.2%. Los productos lisados se incubaron en hielo durante 10 minutos. Se combinaron 15 µL de Producto lisado con 5 µL de tampón de muestra NuPAGE LDS.

Las muestras se sometieron a SDS-PAGE de gradiente 8-16% a 185 V durante 75 minutos. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Los transferencias se bloquearon con tampón de bloqueo sin proteínas Intercept durante 1 hora a temperatura ambiente. Las transferencias se tiñeron con el anticuerpo primario, Anti-F de hMPV de Ratón (hMPV24) NBP2-50505 (Novus), en tampón de bloqueo sin proteínas Intercept durante una noche a 4°C. Las transferencias se lavaron con TBST 3x5 minutos. Las transferencias se tiñeron con el anticuerpo secundario anti-800 de ratón de burro en tampón de bloqueo Intercept durante 1 hora a temperatura ambiente. Las transferencias se lavaron con TBST 4x5 minutos, y a continuación, se escanearon en Licor Odyssey.

Los resultados se muestran en la **FIG. 13**. D185P mostró una expresión robusta cerca del peso molecular esperado de 60kDa. T160F_N46V mostró una expresión proteica, pero la señal fue significativamente menor que D185P.

Células HSKM

Los ARNm se transfectaron a células de músculo esquelético humano (HSKM) en placas de 24 pocillos. Tras 24 horas, se utilizó la citometría de flujo para medir la expresión del epítipo. Número de células/pocillo = 100k. Tras 24 horas de transfección, los pocillos se lavaron con PBS y se añadió tripsina (0.25%) para desprender las células. Las células se distribuyeron en placas de 96 pocillos para la citometría de flujo y se trataron para la tinción intracelular (Cytoperm) antes de añadir los anticuerpos. El anticuerpo secundario fue anti-IgG Humana de Cabra (Jackson Immuno Research - Núm. Cat. 109-115-098).

Los niveles de expresión del D185P de hMPV MNR fueron similares a los de CAN97-83 de hMPV MNR. T160F_N46V de hMPV MNR mostró mayores niveles de expresión para todos los epítipos.

Ejemplo 11: Inmunogenicidad de las construcciones proteicas del antígeno F de hMPV pre- y post-estabilizadas en un sistema MIMIC

Introducción:

El sistema MIMIC© (Modular Immune In vitro Construct) puede estimular respuestas inmunitarias innatas y adaptativas *in vitro* que se producen en el sitio de vacunación/infección *in vivo*. Williams *et al.* (2015) Sanofi Pasteur Poster, "In vitro differentiation of class-switched YF specific antibody secreting cells from naïve B cells". El uso del sistema MIMIC puede recapitular algunos aspectos exclusivos de la fisiología humana, p. ej., los haplotipos HLA, la edad, el estado autoinmunitario y el sexo, complementando así los estudios de inmunogenicidad realizados en modelos animales. Higbee *et al.* (2009) ATLA 37: 19-27.

Para ello, se probaron construcciones proteicas de antígeno F pre- y post-hMPV en un sistema MIMIC para evaluar la calidad de la respuesta inmunogénica con relación a los controles. Los grupos de control incluyeron: control sin tratar (sin antígeno sin células musculares esqueléticas humanas (sin HSK)), antígeno de referencia - proteína pre-F de VRS fusionada a nanopartículas de ferritina (pre-F NP) y vacuna contra la polio (IPOL).

Material y métodos

Brevemente, se cosecharon PBMC mediante un kit de separación de cuentas magnéticas de 22 donantes de sangre humanos diferentes. Se añadieron células dendríticas humanas (CD) y células B seleccionadas de las mismas y se cocultivaron con células musculares esqueléticas humanas (HSKMC) y se estimularon con la proteína del antígeno pre-F de hMPV (a 100 ng/ml o 500 ng/ml) o con la proteína del antígeno post-F de hMPV (100 ng/ml). Para las respuestas de las células B, después de 14 días de cocultivo, se recogieron los sobrenadantes y se analizaron para determinar la especificidad y la función de los anticuerpos.

Resultados:

La **FIG. 15** muestra la configuración MIMIC. Se observaron niveles similares de expresión para T160F_N46V y D185P a dosis de 75 ng/ml y 375 ng/ml para el epítipo pre-F/post-F compartido (**FIG. 14**, paneles A-C). Para confirmar la activación de los cocultivos MIMIC, se utilizaron como controles positivos la vacuna antipoliomielítica previamente analizada (IPOL) y el antígeno (pre-F de VRS-NP). Como se muestra en la **FIG. 16**, paneles A-C, el tratamiento con IPOL a una dilución de 1:50 provocó una respuesta de anticuerpos a tres cepas de polio (Polio 1, 2 y 3) con respecto al control no tratado. Del mismo modo, el tratamiento con 50 ng/ml de pre-F de VRS NP del cocultivo provocó una respuesta de anticuerpos específicos IgG tanto contra pre-F de VRS (**FIG. 17**, panel A) como contra post-F VRS (**FIG. 17**, panel B). Adicionalmente, estos anticuerpos también fueron funcionales según se midió en un ensayo de neutralización de VRS (**FIG. 17**, panel C).

Las proteínas pre-F y post-F de hMPV mostraron altas respuestas de anticuerpos pre-F y post-F (**FIG. 18**, paneles A y B) y altos títulos de anticuerpos neutralizantes (**FIG. 19**).

Los sobrenadantes de los cocultivos tratados con los grupos experimentales, la proteína del antígeno pre-F de hMPV o la proteína del antígeno post-F de hMPV provocaron una respuesta robusta de

anticuerpos IgG tanto al antígeno pre-F de hMPV (**FIG. 20**, panel A) como post-F de hMPV (**FIG. 20**, panel B) con respecto al control sin antígeno. Asimismo, estos anticuerpos fueron funcionales según se midió en un ensayo de neutralización de hMPV (**FIG. 21**). Los anticuerpos de los tres grupos de tratamiento se unieron al antígeno F pre- y post-fusión de hMPV y neutralizaron la infectividad viral apoyando la noción de que el hMPV pre- y post-fusión comparten epítomos neutralizantes.

Otras realizaciones de la divulgación serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la memoria descriptiva y de la práctica de la divulgación divulgada en el presente documento. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren únicamente como ilustrativos, siendo el verdadero alcance y espíritu de la divulgación el indicado por las siguientes reivindicaciones.

Todas las patentes y publicaciones citadas en el presente documento se incorporan al presente documento como referencia en su totalidad.