

COMBINACIÓN DE VACUNAS RESPIRATORIAS DE ARNM

SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional de EE. UU. N.º de serie 63/465,389, presentada el 10 de abril de 2023
5 y a la solicitud de patente provisional E.P. N.º de serie 24315228.7, presentada el 9 de mayo de 2024; cuyas divulgaciones se incorporan por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

El virus respiratorio sincicial humano (hRSV o RSV, del inglés *human respiratory syncytial virus*), el metaneumovirus humano (hMPV, del inglés *human metapneumovirus*) y el virus paragripal humano de tipo 3 (hPIV3 o PIV3, del inglés *human parainfluenza virus type 3*) son patógenos respiratorios asociados con una elevada morbilidad y mortalidad en bebés, niños y adultos mayores, con una carga de morbilidad combinada superior a la de la gripe. Sin vacunas
10 ni terapias específicas disponibles actualmente, existe una necesidad insatisfecha de una vacuna combinada de ARNm segura, eficaz y conveniente para proteger a las personas contra estos patógenos.
15

BREVE SUMARIO DE LA DIVULGACIÓN

En un aspecto, la divulgación proporciona una composición que
20 comprende al menos dos ARN mensajeros (ARNm), en donde los al menos dos ARNm comprenden un marco abierto de lectura (ORF, del inglés *open reading frame*) que codifica un polipéptido antigénico de la proteína F recombinante seleccionado del grupo que consiste en: (i) un primer ARNm que codifica un antígeno proteico F del virus respiratorio sincicial humano (hRSV) que
25 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (ii) un segundo ARNm que codifica un antígeno proteico F del metaneumovirus humano (hMPV) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (iii) un tercer ARNm que codifica un antígeno proteico F del virus paragripal humano 3 (hPIV3) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

30 En determinadas realizaciones, la composición comprende el primer ARNm que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y el segundo ARNm que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

En determinadas realizaciones, la composición comprende el primer ARNm que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y el tercer ARNm que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En determinadas realizaciones, la composición comprende el segundo
5 ARNm que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y el tercer ARNm que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En determinadas realizaciones, la composición comprende al menos tres ARNm, que incluyen: el primer ARNm que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; el segundo ARNm que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y el tercer ARNm que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
10

En determinadas realizaciones, la composición comprende tres ARNm, que incluyen: el primer ARNm que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; el segundo ARNm que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y el tercer ARNm que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
15

En determinadas realizaciones, la proteína F del hRSV comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.

En determinadas realizaciones, la proteína F del hMPV comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 2.
20

En determinadas realizaciones, la proteína F del hPIV3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 3.
25

En determinadas realizaciones, el primer ARNm comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 4.

En determinadas realizaciones, el segundo ARNm comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 5.
30

En determinadas realizaciones, el tercer ARNm comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 6.

5 En determinadas realizaciones, al menos uno de los polipéptidos antigénicos de la proteína F recombinante es una proteína de prefusión.

En determinadas realizaciones, al menos uno de los ARNm comprende un ORF con codones optimizados.

10 En determinadas, al menos uno de los ARNm comprende al menos una región no traducida en 5' (5' UTR, del inglés *5' untranslated region*), al menos una región no traducida en 3' (3' UTR, del inglés *3' untranslated region*) y al menos una secuencia de poliadenilación (poli(A)).

En determinadas realizaciones, al menos uno de los ARNm comprende una 5' UTR que comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 7.

15 En determinadas realizaciones, al menos uno de los ARNm comprende una 3' UTR que comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 8.

En determinadas realizaciones, al menos uno de los ARNm comprende al menos una modificación química.

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

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

30 En determinadas realizaciones, la modificación química se selecciona del grupo que consiste en pseudouridina, N1-metilpseudouridina, 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitosina, 2-tio-I-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-I-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-1-metil-pseudouridina, 4-tio-pseudouridina, 5-aza-uridina, dihidropseudouridina, 5-metiluridina, 5-metiluridina, 5-metoxiuridina y 2'-O-metiluridina.

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

En determinadas realizaciones, la modificación química es N1-metilpseudouridina.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm, el segundo ARNm y el tercer ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1:1:1.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm, el segundo ARNm y el tercer ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1:2:1.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm, el segundo ARNm y el tercer ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1:3:1.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm, el segundo ARNm y el tercer ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1:5:1.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm, el segundo ARNm y el tercer ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1:1:1 a aproximadamente 1:10:1.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm, el segundo ARNm y el tercer ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1:1:0.1 a aproximadamente 1:1:1.

En determinadas realizaciones, la proporción se expresa en microgramos (μg).

En determinadas realizaciones, el primer ARNm, el segundo ARNm y el tercer ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente un

microgramo del primer ARNm a aproximadamente un microgramo del segundo ARNm a aproximadamente un microgramo del tercer ARNm.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm, el segundo ARNm y el tercer ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente un
5 microgramo del primer ARNm a aproximadamente dos microgramos del segundo ARNm a aproximadamente un microgramo del tercer ARNm.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm, el segundo ARNm y el tercer ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente un microgramo del primer ARNm a aproximadamente tres microgramos del
10 segundo ARNm a aproximadamente un microgramo del tercer ARNm.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm, el segundo ARNm y el tercer ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente un microgramo del primer ARNm a aproximadamente cinco microgramos del segundo ARNm a aproximadamente un microgramo del tercer ARNm.

15 En determinadas realizaciones, el primer ARNm, el segundo ARNm y el tercer ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 0.5 microgramos del primer ARNm a aproximadamente 0.5 microgramos del segundo ARNm a aproximadamente 0.5 microgramos del tercer ARNm.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm, el segundo ARNm y el
20 tercer ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 0.5 microgramos del primer ARNm a aproximadamente 1.5 microgramos del segundo ARNm a aproximadamente 0.5 microgramos del tercer ARNm.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm, el segundo ARNm y el tercer ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 0.5
25 microgramos del primer ARNm a aproximadamente 0.5 microgramos del segundo ARNm a aproximadamente 0.1 microgramos del tercer ARNm.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm, el segundo ARNm y el tercer ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 0.5 microgramos del primer ARNm a aproximadamente 1 microgramos del segundo
30 ARNm a aproximadamente 0.5 microgramos del tercer ARNm.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm, el segundo ARNm y el tercer ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 0.5

microgramos del primer ARNm a aproximadamente 2.5 microgramos del segundo ARNm a aproximadamente 0.5 microgramos del tercer ARNm.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm, el segundo ARNm y el tercer ARNm no están unidos covalentemente entre sí.

- 5 En determinadas realizaciones, uno o más del primer ARNm, el segundo ARNm y el tercer ARNm están unidos covalentemente entre sí.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm, el segundo ARNm y el tercer ARNm se formulan cada uno en una nanopartícula (LNP) separada.

- 10 En determinadas realizaciones, el primer ARNm, el segundo ARNm y el tercer ARNm se formulan en la misma LNP.

En determinadas realizaciones, la LNP comprende al menos un lípido catiónico.

En determinadas realizaciones, el lípido catiónico es biodegradable.

En determinadas realizaciones, el lípido catiónico no es biodegradable.

- 15 En determinadas realizaciones, el lípido catiónico es escindible.

En determinadas realizaciones, el lípido catiónico no es escindible.

En determinadas realizaciones, el lípido catiónico se selecciona del grupo que consiste en OF-02, cKK-E10, GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1, GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 e IM-001.

- 20 En determinadas realizaciones, el lípido catiónico es cKK-E10.

En determinadas realizaciones, el lípido catiónico es GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10.

En determinadas realizaciones, el lípido catiónico es IM-001.

- 25 En determinadas realizaciones, la LNP comprende además un lípido conjugado con polietilenglicol (PEG) (PEGilado), un lípido basado en colesterol y un lípido auxiliar.

- 30 En determinadas realizaciones, la LNP comprende: un lípido catiónico en una proporción molar del 35 % al 55 %; un lípido conjugado con polietilenglicol (PEG) (PEGilado) en una proporción molar del 0.25 % al 2.75 %; un lípido basado en colesterol en una proporción molar del 20 % al 45 %; y un lípido auxiliar en una proporción molar del 5 % al 35 %, en donde todas las proporciones molares son relativas al contenido total de lípidos de la LNP.

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: un lípido catiónico en una proporción molar del 40 %; un lípido PEGilado en una proporción molar del 1.5 %; un lípido basado en colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y un lípido auxiliar en una proporción molar del 30 %.

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

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

- 10 En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar es 1,2-dioleoil-SN-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) o 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC).

- En determinadas realizaciones, la LNP comprende: GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 en una proporción molar del 40 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %; colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y DOPE en una proporción molar del 30 %.
- 15

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: cKK-E10 en una proporción molar del 40 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %; colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y DOPE en una proporción molar del 30 %.

- 20 En determinadas realizaciones, la LNP comprende: IM-001 en una proporción molar del 40 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %; colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y DOPE en una proporción molar del 30 %.

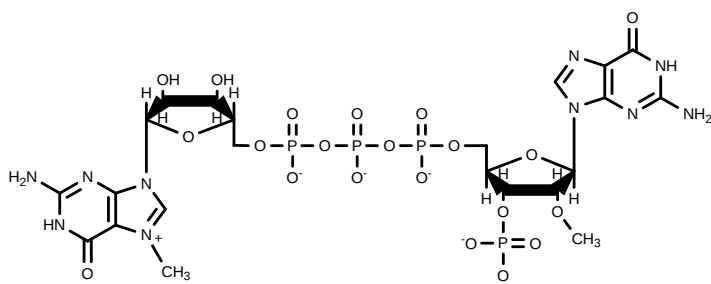
- En determinadas realizaciones, la LNP tiene un diámetro promedio de 30 nm a 200 nm.
- 25

En determinadas realizaciones, la LNP tiene un diámetro promedio de 80 nm a 150 nm.

En determinadas realizaciones, al menos uno de los ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

- 30 (i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:

5



(ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;

10

(iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4, 5 o 6;

(iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y

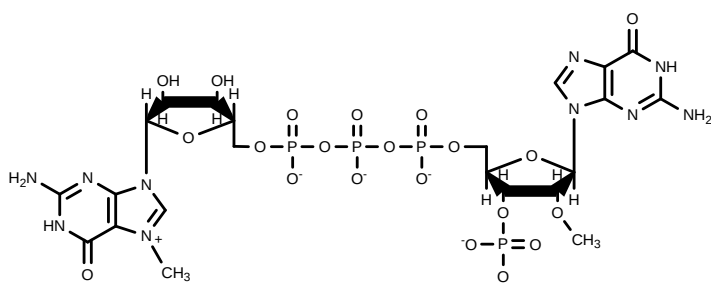
(v) una cola poli(A).

15

En un aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende al menos dos ARNm, en donde cada uno de los al menos dos ARNm comprende un ORF que codifica un polipéptido antigénico de proteína F recombinante, en donde al menos uno de los ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

(i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:

20



25

(ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;

(iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4, 5 o 6;

30

(iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y

(v) una cola poli(A);

DOPE en una proporción molar del 30 %.

(i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:

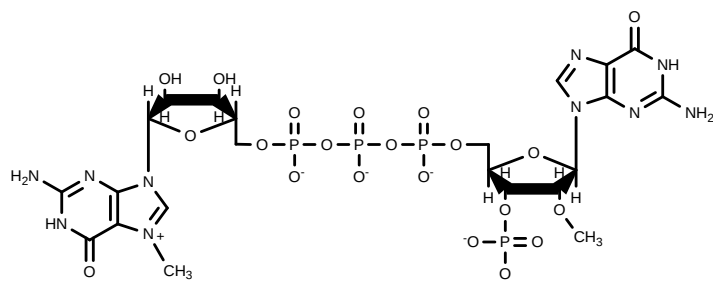


- 9 -

comprende un ORF que codifica un polipéptido antigénico de proteína F recombinante, en donde al menos uno de los ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

(i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:

5



10

(ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;

(iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4, 5 o 6;

15

(iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y

(v) una cola poli(A);

en donde el ARNm se formula en una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende:

20

IM-001 en una proporción molar del 40 %;

DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %;

colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y

DOPE en una proporción molar del 30 %.

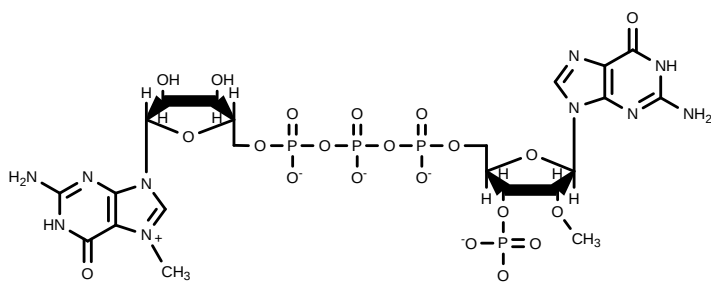
25

En un aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende al menos dos ARNm, en donde cada uno de los al menos dos ARNm comprende un ORF que codifica un polipéptido antigénico de proteína F recombinante, en donde al menos uno de los ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

(i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:

30

5



10

- (ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;
- (iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4, 5 o 6;
- (iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y
- (v) una cola poli(A);

15

en donde el ARNm se formula en una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende: GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, IM-001, OF-02 o cKK-E10 en una proporción molar del 35 % al 55 %.

20

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria al hRSV o proteger a un sujeto contra una infección por hRSV, que comprende administrar las composiciones descritas anteriormente a un sujeto.

25

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria al hMPV o proteger a un sujeto contra una infección por hMPV, que comprende administrar las composiciones descritas anteriormente a un sujeto.

30

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria al hPIV3 o proteger a un sujeto contra una infección por hPIV3, que comprende administrar las composiciones descritas anteriormente a un sujeto.

En determinadas realizaciones, el sujeto tiene aproximadamente la misma o mayor concentración en suero de anticuerpos neutralizantes contra hRSV después de la administración de la composición, en relación con un sujeto al que se le administra una única composición antigénica que comprende un ORF de ARNm que codifica un antígeno proteico F del hRSV de SEQ ID NO: 1.

En determinadas realizaciones, el sujeto tiene aproximadamente la misma o mayor concentración en suero de anticuerpos neutralizantes contra hMPV después de la administración de la composición, en relación con un sujeto al que se le administra una única composición antigénica que comprende un ORF de
5 ARNm que codifica un antígeno proteico F del hMPV de SEQ ID NO: 2.

En determinadas realizaciones, el sujeto tiene aproximadamente la misma o mayor concentración en suero de anticuerpos neutralizantes contra hPIV3 después de la administración de la composición, en relación con un sujeto al que se le administra una única composición antigénica que comprende un ORF de
10 ARNm que codifica un antígeno proteico F del hPIV3 de SEQ ID NO: 3.

En determinadas realizaciones, el sujeto tiene una concentración en suero comparable de anticuerpos neutralizantes contra hRSV después de la administración de la composición, en relación con un sujeto al que se le administra una vacuna proteica de hRSV.

15 En determinadas realizaciones, el sujeto tiene una concentración en suero comparable de anticuerpos neutralizantes contra hMPV después de la administración de la composición, en relación con un sujeto al que se le administra una vacuna proteica de hMPV.

En determinadas realizaciones, el sujeto tiene una concentración en suero comparable de anticuerpos neutralizantes contra hPIV3 después de la administración de la composición, en relación con un sujeto al que se le administra una vacuna proteica de hPIV3.

20 En determinadas realizaciones, la composición aumenta la concentración en suero de anticuerpos neutralizantes en un sujeto con inmunidad preexistente al hRSV.

25 En determinadas realizaciones, la composición aumenta la concentración en suero de anticuerpos neutralizantes en un sujeto con inmunidad preexistente al hMPV.

En determinadas realizaciones, la composición aumenta la concentración en suero de anticuerpos neutralizantes en un sujeto con inmunidad hPIV3 preexistente.

30

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición para su uso para provocar una respuesta inmunitaria al hRSV o proteger a un sujeto contra una infección por hRSV, que comprende administrar las composiciones descritas anteriormente a un sujeto.

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición para su uso para provocar una respuesta inmunitaria al hMPV o proteger a un sujeto contra una infección por hMPV, que comprende administrar las composiciones descritas anteriormente a un sujeto.

10 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición para su uso para provocar una respuesta inmunitaria al hPIV3 o proteger a un sujeto contra una infección por hPIV3, que comprende administrar las composiciones descritas anteriormente a un sujeto.

15 En otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de la composición en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria al hRSV o proteger a un sujeto contra una infección por hRSV.

En otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de la composición en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria al hMPV o proteger a un sujeto contra una infección por hMPV.

20 En otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de la composición en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria al hPIV3 o proteger a un sujeto contra una infección por hPIV3.

En un aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende tres ARNm, en donde:

25 (i) un primer ARNm codifica un antígeno proteico F del hRSV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (ii) un segundo ARNm codifica un antígeno proteico F del metaneumovirus humano (hMPV) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (iii) un tercer ARNm codifica un antígeno proteico F del virus paragripal humano 3 (hPIV3) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; en donde el primer ARNm, el
30 segundo ARNm y el tercer ARNm se formulan en el mismo LNP que comprende: 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 en una proporción molar del 40 %; DMG-

PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %; colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y DOPE en una proporción molar del 30 %.

En un aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende tres ARNm, en donde: (i) un primer ARNm codifica un antígeno proteico F del virus respiratorio sincicial humano (hRSV) que comprende una
5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (ii) un segundo ARNm que codifica un antígeno proteico F del metaneumovirus humano (hMPV) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (iii) un tercer ARNm que codifica un antígeno proteico F del virus paragripal humano 3 (hPIV3) que comprende
10 una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En un aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende un primer ARN mensajero (ARNm) y un segundo ARNm, en la que: (i) el primer ARNm codifica un antígeno proteico F del virus respiratorio sincicial humano (hRSV) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:
15 1; y (ii) el segundo ARNm codifica un antígeno proteico F del metaneumovirus humano (hMPV) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm y el segundo ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1:1.

20 En determinadas realizaciones, el primer ARNm y el segundo ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1:2.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm y el segundo ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1:3.

25 En determinadas realizaciones, el primer ARNm y el segundo ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1:5.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm y el segundo ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:10.

30 En determinadas realizaciones, la proporción del primer ARNm y el segundo ARNm se expresa en microgramos (μ g).

En determinadas realizaciones, el primer ARNm y el segundo ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 0.5 microgramos del primer ARNm a aproximadamente 0.5 microgramos del segundo ARNm.

5 En determinadas realizaciones, el primer ARNm y el segundo ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 0.5 microgramos del primer ARNm a aproximadamente 1.5 microgramos del segundo ARNm.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm y el segundo ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 0.5 microgramos del primer ARNm a aproximadamente 1 microgramos del segundo ARNm.

10 En determinadas realizaciones, el primer ARNm y el segundo ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 0.5 microgramos del primer ARNm a aproximadamente 2.5 microgramos del segundo ARNm.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm y el segundo ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1 microgramos del primer ARNm a aproximadamente 1 microgramos del segundo ARNm.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm y el segundo ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1 microgramo del primer ARNm a aproximadamente 2 microgramos del segundo ARNm.

20 En determinadas realizaciones, el primer ARNm y el segundo ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1 microgramo del primer ARNm a aproximadamente 3 microgramos del segundo ARNm.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm y el segundo ARNm están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1 microgramo del primer ARNm a aproximadamente 5 microgramos del segundo ARNm.

25 En determinadas realizaciones, el primer ARNm y el segundo ARNm se formulan cada uno en un LNP separado.

En determinadas realizaciones, el primer ARNm y el segundo ARNm se formulan en el mismo LNP.

30 En determinadas realizaciones, la LNP comprende al menos un lípido catiónico.

En determinadas realizaciones, el lípido catiónico es biodegradable.

En determinadas realizaciones, el lípido catiónico no es biodegradable.

En determinadas realizaciones, el lípido catiónico es escindible.

En determinadas realizaciones, el lípido catiónico no es escindible.

En determinadas realizaciones, el lípido catiónico se selecciona del grupo que consiste en OF-02, cKK-E10, GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1, GL-HEPES-
5 E3-E12-DS-4-E10, GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 e IM-001.

En determinadas realizaciones, el lípido catiónico es cKK-E10.

En determinadas realizaciones, el lípido catiónico es GL-HEPES-E3-E12-
DS-4-E10.

En determinadas realizaciones, el lípido catiónico es IM-001.

10 En determinadas realizaciones, la LNP comprende además un lípido conjugado con polietilenglicol (PEG) (PEGilado), un lípido basado en colesterol y un lípido auxiliar.

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: un lípido catiónico en una proporción molar del 35 % al 55 %; un lípido conjugado con polietilenglicol
15 (PEG) (PEGilado) en una proporción molar del 0.25 % al 2.75 %; un lípido basado en colesterol en una proporción molar del 20 % al 45 %; y un lípido auxiliar en una proporción molar del 5 % al 35 %, en donde todas las proporciones molares son relativas al contenido total de lípidos de la LNP.

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: un lípido catiónico en
20 una proporción molar del 40 %; un lípido PEGilado en una proporción molar del 1.5 %; un lípido basado en colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y un lípido auxiliar en una proporción molar del 30 %.

En determinadas realizaciones, el lípido PEGilado es dimiristoil-PEG2000 (DMG-PEG2000) o 2-[(polietilenglicol)-2000]-N,N-ditetradecilacetamida (ALC-
25 0159).

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

En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar es 1,2-dioleoil-SN-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) o 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC).

30 En determinadas realizaciones, la LNP comprende: GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 en una proporción molar del 40 %; DMG-PEG2000 en una proporción

molar del 1.5 %; colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y DOPE en una proporción molar del 30 %.

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: cKK-E10 en una proporción molar del 40 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %; 5 colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y DOPE en una proporción molar del 30 %.

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: IM-001 en una proporción molar del 40 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %; 10 colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y DOPE en una proporción molar del 30 %.

En determinadas realizaciones, la LNP tiene un diámetro promedio de 30 nm a 200 nm.

En determinadas realizaciones, la LNP tiene un diámetro promedio de 80 nm a 150 nm.

15 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria al hRSV o proteger a un sujeto contra una infección por hRSV, que comprende administrar las composiciones descritas anteriormente a un sujeto.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para provocar una 20 respuesta inmunitaria al hMPV o proteger a un sujeto contra una infección por hMPV, que comprende administrar las composiciones descritas anteriormente a un sujeto.

En determinadas realizaciones, el sujeto tiene aproximadamente la misma o mayor concentración en suero de anticuerpos neutralizantes contra hRSV 25 después de la administración de la composición, en relación con un sujeto al que se le administra una única composición antigénica que comprende un ORF de ARNm que codifica un antígeno proteico F del hRSV de SEQ ID NO: 1.

En determinadas realizaciones, el sujeto tiene aproximadamente la misma o mayor concentración en suero de anticuerpos neutralizantes contra hMPV 30 después de la administración de la composición, en relación con un sujeto al que se le administra una única composición antigénica que comprende un ORF de ARNm que codifica un antígeno proteico F del hMPV de SEQ ID NO: 2.

En determinadas realizaciones, el sujeto tiene una concentración en suero comparable de anticuerpos neutralizantes contra hRSV después de la administración de la composición, en relación con un sujeto al que se le administra una vacuna proteica de hRSV.

- 5 En determinadas realizaciones, el sujeto tiene una concentración en suero comparable de anticuerpos neutralizantes contra hMPV después de la administración de la composición, en relación con un sujeto al que se le administra una vacuna proteica de hMPV.

- 10 En determinadas realizaciones, la composición aumenta la concentración en suero de anticuerpos neutralizantes en un sujeto con inmunidad preexistente al hRSV.

En determinadas realizaciones, la composición aumenta la concentración en suero de anticuerpos neutralizantes en un sujeto con inmunidad preexistente al hMPV.

- 15 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición para su uso para provocar una respuesta inmunitaria al hRSV o proteger a un sujeto contra una infección por hRSV, que comprende administrar las composiciones descritas anteriormente a un sujeto.

- 20 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición para su uso para provocar una respuesta inmunitaria al hMPV o proteger a un sujeto contra una infección por hMPV, que comprende administrar las composiciones descritas anteriormente a un sujeto.

- 25 En otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de la composición en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria al hRSV o proteger a un sujeto contra una infección por hRSV.

En otro aspecto, la divulgación proporciona el uso de la composición en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria al hMPV o proteger a un sujeto contra una infección por hMPV.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

- 30 Lo anterior y otras características y ventajas de la presente divulgación se entenderán más completamente a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones ilustrativas tomada en conjunto con los dibujos adjuntos.

En las figuras 1A a 1F se representa la expresión de proteínas en células de músculo esquelético humano (hSKM, del inglés *human skeletal muscle*) transfectadas con formulaciones monovalentes de ARNm-LNP de hRSV, hPIV3 o hMPV (con dosis que varían de 0.088 µg a 3 µg) y coformulaciones trivalentes de ARNm-LNP de hRSV, hPIV3 y hMPV (con dosis que varían de 0.088 µg a 3 µg en una proporción de 1:1:1). Se formularon construcciones de ARNm con LNP OF-02. 24 horas después de la transfección, las células hSKM se recogieron y se tiñeron con anticuerpos monoclonales de unión prefusión (Figuras 1A, 1C y 1E) o anticuerpos monoclonales de unión a la región común (Figuras 1B, 1D y 1F) y un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. La fluorescencia se cuantificó mediante citometría de flujo y se muestra como intensidad de fluorescencia media integrada (IFMi).

En las figuras 2A a 2F se representa la inmunogenia en ratones después de la vacunación con la coformulación trivalente de ARNm-LNP (que contiene 0.5 µg de ARNm del hRSV prefusión, 0.5 µg de ARNm del hPIV3 prefusión y 0.5 µg de ARNm del hMPV prefusión por dosis), una mezcla de las tres formulaciones monovalentes de ARNm-LNP (que contienen 0.5 µg/dosis de ARNm del hRSV prefusión, 0.5 µg/dosis de ARNm del hPIV3 prefusión y 0.5 µg/dosis de ARNm del hMPV prefusión), o una formulación monovalente de ARNm-LNP (que contiene 0.5 µg/dosis de ARNm del hRSV prefusión, ARNm del hPIV3 prefusión o ARNm del hMPV prefusión). Se formularon construcciones de ARNm con LNP OF-02. Todas las formulaciones se diluyeron en trehalosa. Los ratones recibieron refuerzos con la misma pauta 21 días después de la primovacunación, y se extrajo sangre antes de la primera inmunización (día 0) y 2 semanas después de la segunda inmunización (día 35). Los valores de los anticuerpos de unión se determinaron mediante ELISA usando placas recubiertas con hRSV prefusión (Figura 2A), hPIV3 prefusión (Figura 2C) o hMPV prefusión (Figura 2E). Los valores de los anticuerpos neutralizantes se determinaron mediante microneutralización contra hRSV (Figura 2B), hPIV3 (Figura 2D) o hMPV (Figura 2F) que expresan indicadores de proteína fluorescente verde (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*). Las muestras del día 0 se analizaron como grupos en el ensayo de microneutralización. Las

líneas de puntos representan límites inferiores de cuantificación. Las barras de error representan 1 desviación estándar geométrica de la media geométrica. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA bidireccional de modelo mixto (*p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001).

5 En las figuras 3A a 3F se representa la inmunogenia en ratones después de la vacunación con una mezcla de proteínas recombinantes de hRSV, hPIV3 y hMPV prefusión, o una proteína recombinante monovalente de hRSV, hPIV3 o hMPV prefusión. Se vacunaron grupos de ratones por vía intramuscular con una mezcla (que contenía 0.5 µg cada una de las proteínas recombinantes de hRSV,
10 hPIV3 y hMPV prefusión) con el adyuvante Alhidrogel® al 2 % (gel de hidróxido de aluminio), o una proteína recombinante monovalente prefusión (que contenía 0.5 µg/dosis de proteína del hRSV prefusión, proteína del hPIV3 prefusión o proteína del hMPV prefusión) con el adyuvante Alhidrogel®. Todas las formulaciones se diluyeron en trehalosa. Los ratones recibieron refuerzos con la
15 misma pauta 21 días después de la primovacunación, y se extrajo sangre antes de la primera inmunización (día 0) y 2 semanas después de la segunda inmunización (día 35). Los valores de los anticuerpos de unión se determinaron mediante ELISA usando placas recubiertas con hRSV (Figura 3A), del hPIV3 (Figura 3B) o del hMPV (Figura 3C) prefusión. Los valores de los anticuerpos
20 neutralizantes se determinaron mediante microneutralización contra hRSV (Figura 3D), hPIV3 (Figura 3E) o hMPV (Figura 3F) que expresan un indicador de proteína fluorescente verde GFP. Las muestras del día 0 se procesaron en el ensayo de microneutralización como grupos. Las líneas de puntos representan límites inferiores de cuantificación. Las barras de error representan 1 desviación
25 estándar geométrica de la media geométrica. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA bidireccional de modelo mixto (*p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001).

 En las figuras 4A a 4F se representa la inmunogenia en ratones después de aumentar las dosis de hMPV en una mezcla de formulaciones monovalentes
30 de ARNm-LNP de hRSV, hMPV y hPIV3 en LNP OF-02. Se inmunizaron grupos de ratones por vía intramuscular con una mezcla 1:1:1, 1:2:1 o 1:5:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 prefusión, o 0.5 µg/dosis de ARNm monovalente del

hMPV. Todas las formulaciones se diluyeron en trehalosa. Los ratones recibieron refuerzos con la misma pauta 21 días después de la primovacunación, y se extrajo sangre antes de la primera inmunización (día 0) y 2 semanas después de la segunda inmunización (día 35). Los valores de los anticuerpos de unión se determinaron mediante ELISA usando placas recubiertas con hRSV (Figura 4A), del hPIV3 (Figura 4B) o del hMPV (Figura 4C) prefusión. Los valores de los anticuerpos neutralizantes se determinaron mediante microneutralización contra hRSV (Figura 4D), hPIV3 (Figura 4E) o hMPV (Figura 4F) que expresan un indicador de proteína fluorescente verde GFP. Las muestras del día 0 se procesaron en el ensayo de microneutralización como grupos. Las líneas de puntos representan límites inferiores de cuantificación. Las barras de error representan 1 desviación estándar geométrica de la media geométrica. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA bidireccional de modelo mixto (*p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001).

En las figuras 5A a 5F se representa la inmunogenia en ratones después de disminuir las dosis de hPIV3 en una mezcla de formulaciones monovalentes de ARNm-LNP de hRSV, hMPV y hPIV3 en LNP OF-02. Se inmunizaron grupos de ratones por vía intramuscular con una mezcla 1:1:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 prefusión (es decir, 0.5 µg de ARNm del hRSV prefusión, 0.5 µg del hMPV prefusión y 0.5 µg de ARNm de hPIV3), una mezcla 1:1:0.2 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 prefusión (es decir, 0.5 µg de ARNm del hRSV prefusión, 0.5 µg del hMPV prefusión y 0.1 µg de ARNm de hPIV3), o 0.1 µg/dosis de ARNm monovalente del hPIV3. Todas las formulaciones se diluyeron en trehalosa. Los ratones recibieron refuerzos con la misma pauta 21 días después de la primovacunación, y se extrajo sangre antes de la primera inmunización (día 0) y 2 semanas después de la segunda inmunización (día 35). Los valores de los anticuerpos de unión se determinaron mediante ELISA usando placas recubiertas con hRSV (Figura 5A), del hPIV3 (Figura 5B) o del hMPV (Figura 5C) prefusión. Los valores de los anticuerpos neutralizantes se determinaron mediante microneutralización contra hRSV (Figura 5D), hPIV3 (Figura 5E) o hMPV (Figura 5F) que expresan un indicador de proteína fluorescente verde GFP. Las muestras del día 0 se procesaron en el ensayo de

microneutralización como grupos. Las líneas de puntos representan límites inferiores de cuantificación. Las barras de error representan 1 desviación estándar geométrica de la media geométrica. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA bidireccional de modelo mixto (*p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001).

En las figuras 6A a 6F se representa la inmunogenia en ratones después de aumentar las dosis de hMPV en coformulaciones trivalentes de hRSV:hMPV:hPIV3 probadas en LNP OF-02. Se inmunizaron grupos de ratones por vía intramuscular con una coformulación 1:1:1, 1:2:1 o 1:5:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 prefusión, o una formulación monovalente (que contenía 0.5 µg/dosis de cualquiera de los ARNm del hRSV prefusión, ARNm del hPIV3 prefusión o ARNm del hMPV prefusión). Todas las formulaciones se diluyeron en trehalosa. Los ratones recibieron refuerzos con la misma pauta 21 días después de la primovacunación, y se extrajo sangre antes de la primera inmunización (día 0) y 2 semanas después de la segunda inmunización (día 35). Los valores de los anticuerpos de unión se determinaron mediante ELISA usando placas recubiertas con hRSV (Figura 6A), del hPIV3 (Figura 6C) o del hMPV (Figura 6E) prefusión. Los valores de los anticuerpos neutralizantes se determinaron mediante microneutralización contra hRSV (Figura 6B), hPIV3 (Figura 6D) o hMPV (Figura 6F) que expresan un indicador de proteína fluorescente verde GFP. Las muestras del día 0 se procesaron en el ensayo de microneutralización como grupos. Las líneas de puntos representan límites inferiores de cuantificación. Las barras de error representan 1 desviación estándar geométrica de la media geométrica. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA bidireccional de modelo mixto (*p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001).

En las figuras 7A a 7F se representa la inmunogenia en ratones después de aumentar las dosis de hMPV en coformulaciones trivalentes de hRSV:hMPV:hPIV3 probadas en LNP cKK-E10. Se inmunizaron grupos de ratones por vía intramuscular con una coformulación 1:2:1 o 1:5:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 prefusión, o una formulación monovalente (que contenía 0.5 µg/dosis de cualquiera de los ARNm del hRSV prefusión, ARNm del hPIV3

prefusión o ARNm del hMPV prefusión). Todas las formulaciones se diluyeron en trehalosa. Los ratones recibieron refuerzos con la misma pauta 21 días después de la primovacunación, y se extrajo sangre antes de la primera inmunización (día 0) y 2 semanas después de la segunda inmunización (día 35).

5 Los valores de los anticuerpos de unión se determinaron mediante ELISA usando placas recubiertas con hRSV (Figura 7A), del hPIV3 (Figura 7C) o del hMPV (Figura 7E) prefusión. Los valores de los anticuerpos neutralizantes se determinaron mediante microneutralización contra hRSV (Figura 7B), hPIV3 (Figura 7D) o hMPV (Figura 7F) que expresan un indicador de proteína

10 fluorescente verde GFP. Las muestras del día 0 se procesaron en el ensayo de microneutralización como grupos. Las líneas de puntos representan límites inferiores de cuantificación. Las barras de error representan 1 desviación estándar geométrica de la media geométrica. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA bidireccional de modelo mixto (*p <0.05, **p <0.01,

15 ***p <0.001).

En las figuras 8A a 8C se representan transferencias Western para la expresión de proteínas de hRSV (Figura 8A), hMPV (Figura 8B) y hPIV3 (Figura 8C) en coformulaciones 1:1:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3, coformulaciones 1:3:1 de hRSV:hMPV:hPIV3 y formulaciones monovalentes de hRSV, hMPV y

20 hPIV3 analizadas con LNP OF-02, LNP cKK-E10 o LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10. Las células HeLa sembradas en placas de 24 pocillos a 0.075 millones de células/pocillo durante la noche se transfectaron al día siguiente con 1 µg/millón de células de las formulaciones de ARNm indicadas. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se lisaron y los lisados clarificados

25 se procesaron en un gradiente de SDS-PAGE del 8 al 16 %. Después de la transferencia a una membrana de nitrocelulosa, se detectó la expresión de las proteínas de hRSV, hMPV y hPIV3 con los anticuerpos CR9501, SAN27K-37 o SAN52-36, respectivamente. Todas las formulaciones que contenían ARNm de hRSV, hMPV o hPIV3 fueron positivas para la expresión de las proteínas

30 correspondientes.

En las figuras 9A a 9F se representa la inmunogenia en ratones después de la inmunización con coformulaciones trivalentes de hRSV:hMPV:hPIV3

probadas en LNP OF-02, LNP cKK-E10 o LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10
 cuya expresión de proteínas se confirmó en la figura 8. Se inmunizaron grupos
 de ratones por vía intramuscular con una coformulación 1:1:1 de ARNm de
 hRSV:hMPV:hPIV3 (que contenía 0.5 µg de ARNm del hRSV prefusión, 0.5 µg
 5 de ARNm del hMPV prefusión y 0.5 µg de ARNm del hPIV3 prefusión por dosis)
 formulada con LNP OF-02, LNP cKK-E10 o LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10;
 una coformulación 1:3:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 (que contenía 0.5 µg
 de ARNm del hRSV prefusión, 1.5 µg de ARNm del hMPV prefusión y 0.5 µg de
 ARNm del hPIV3 prefusión por dosis) formulada con LNP OF-02, LNP cKK-E10
 10 o LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10; o 0.5 µg/dosis de ARNm monovalente de
 RSV, hMPV o hPIV3 formulado con LNP OF-02, LNP cKK-E10 o LNP GL-
 HEPES-E3-E12-DS-4-E10. Las formulaciones se diluyeron a las
 concentraciones indicadas con solución salina tamponada con fosfato (PBS).
 Los ratones recibieron refuerzos con la misma pauta 21 días después de la
 15 primovacunación, y se extrajo sangre antes de la primera inmunización (día 0),
 antes de la segunda inmunización (día 21) y 2 semanas después de la segunda
 inmunización (día 35). Los valores de los anticuerpos de unión se determinaron
 mediante ELISA usando placas recubiertas con hMPV (Figura 9B), del hPIV3
 (Figura 9D) o del hRSV (Figura 9F) prefusión. Los valores de los anticuerpos
 20 neutralizantes se determinaron mediante microneutralización contra hMPV
 (Figura 9A), hPIV3 (Figura 9C) o hRSV (Figura 9E) que expresan un indicador
 de GFP. Las líneas de puntos representan límites inferiores de cuantificación.
 Todas las muestras del día 0 estuvieron por debajo del límite inferior de
 cuantificación en todos los ensayos. Las muestras de los grupos inmunizados
 25 con formulaciones monovalentes se analizaron únicamente frente a las dianas
 correspondientes. Las barras de error representan 1 desviación estándar
 geométrica de la media geométrica. Los análisis estadísticos se realizaron
 mediante ANOVA bidireccional de modelo mixto (*p <0.05, **p <0.01,
 ***p <0.001).
 30 En la figura 10 se representan valores de anticuerpos neutralizantes para
 construcciones de ARNm de hRSV, hMPV y hPIV3 diluidos con PBS en
 comparación con valores de anticuerpos neutralizantes para construcciones de

ARNm de hRSV, hMPV y hPIV3 diluidas con trehalosa. Se inmunizaron grupos de ratones por vía intramuscular con una coformulación 1:1:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 (que contenía 0.5 µg de ARNm del hRSV prefusión, 0.5 µg de ARNm del hMPV prefusión y 0.5 µg de ARNm del hPIV3 prefusión por dosis) formulada con LNP OF-02 diluida a esta concentración con trehalosa o PBS. Los ratones recibieron refuerzos con la misma pauta 21 días después de la primovacunación, y se extrajo sangre antes de la primera inmunización (día 0), antes de la segunda inmunización (día 21) y 2 semanas después de la segunda inmunización (día 35). Los valores de los anticuerpos neutralizantes se determinaron mediante microneutralización contra hMPV, hPIV3 o hRSV que expresan un indicador de GFP. Las líneas de puntos representan límites inferiores de cuantificación. Todas las muestras del día 0 estuvieron por debajo del límite inferior de cuantificación en todos los ensayos. Las barras de error representan 1 desviación estándar geométrica de la media geométrica. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA bidireccional de modelo mixto (*p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001).

En las figuras 11A a 11D se representa la inmunogenia en ratones después de la inmunización con coformulaciones bivalentes de hRSV:hMPV probadas en LNP OF-02, LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 o LNP IM-001. Se inmunizaron grupos de ratones con una coformulación 1:1 de ARNm de hRSV:hMPV (que contenía 0.5 µg de ARNm del hRSV prefusión y 0.5 µg de ARNm del hMPV prefusión por dosis) formulada con LNP OF-02, LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 o LNP IM-001; o 0.5 µg/dosis de ARNm monovalente de hRSV o hMPV formulado con LNP OF-02, LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 o LNP IM-001. Todas las formulaciones se diluyeron en PBS. Los ratones recibieron refuerzos con la misma pauta 21 días después de la primovacunación, y se extrajo sangre antes de la primera inmunización (día 0), antes de la segunda inmunización (día 21) y 2 semanas después de la segunda inmunización (día 35). Los valores de los anticuerpos de unión se determinaron mediante ELISA usando placas recubiertas con hRSV (Figura 11B) o del hMPV (Figura 9D) prefusión. Los valores de los anticuerpos neutralizantes se determinaron mediante microneutralización contra hRSV (Figura 11A) o hMPV (Figura 11C)

que expresan un indicador de GFP. Las líneas de puntos representan límites inferiores de cuantificación. Todas las muestras del día 0 estuvieron por debajo del límite inferior de cuantificación en todos los ensayos. Las muestras de los grupos inmunizados con formulaciones monovalentes se analizaron únicamente frente a las dianas correspondientes. Las barras de error representan 1 desviación estándar geométrica de la media geométrica. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA bidireccional de modelo mixto (*p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001).

En las figuras 12A a 12B se representa la inmunogenia de hRSV, hMPV y hPIV3 en ratones después de la inmunización con una coformulación bivalente de hRSV:hMPV sola o administrada junto con una mezcla de hPIV3. Se inmunizaron grupos de ratones con una coformulación bivalente 1:1 de ARNm de hRSV:hMPV (que contenía 0.5 µg de ARNm del hRSV prefusión y 0.5 µg de ARNm del hMPV prefusión por dosis); una coformulación bivalente 1:1 de ARNm de hRSV:hMPV (que contenía 0.5 µg de ARNm del hRSV prefusión y 0.5 µg de ARNm del hMPV prefusión por dosis) administrada junto con una mezcla de hPIV3 (que contenía 0.5 µg/dosis de ARNm del hPIV3 prefusión); o hPIV3 monovalente (que contenía 0.5 µg/dosis de ARNm del hPIV3 prefusión) como control. Cada construcción de ARNm se formuló con LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 y se diluyó en PBS. Los ratones recibieron refuerzos con la misma pauta 21 días después de la primovacunación, y se extrajo sangre antes de la primera inmunización (día 0), antes de la segunda inmunización (día 21) y 2 semanas después de la segunda inmunización (día 35). Los valores de los anticuerpos de unión se determinaron mediante ELISA (Figura 12A) usando placas recubiertas con hMPV, hPIV3 o hRSV prefusión. Los valores de los anticuerpos neutralizantes (Figura 12B) se determinaron mediante microneutralización contra hMPV, hPIV3 o hRSV que expresan un indicador de GFP. Las líneas de puntos representan límites inferiores de cuantificación. Todas las muestras del día 0 estuvieron por debajo del límite inferior de cuantificación en todos los ensayos. Todas las muestras se probaron contra las tres dianas. Las barras de error representan 1 desviación estándar geométrica de la media

geométrica. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA bidireccional de modelo mixto (*p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DIVULGACIÓN

La presente divulgación se refiere, entre otras cosas, a nuevas composiciones de ARN (por ejemplo, ARNm) que codifican una combinación de proteínas F de hRSV, proteínas de hMPV y/o proteínas de hPIV3, y métodos de vacunación con las mismas. En particular, las divulgaciones se refieren al ARNm que codifica estas proteínas formuladas en una nanopartícula lipídica (LNP).

I. Definiciones

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. A continuación, se describen métodos y materiales de ejemplo, aunque también se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la puesta en práctica o la evaluación de la presente divulgación. En caso de contradicción, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones. Generalmente, la nomenclatura utilizada en relación con, 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 es una muy conocida y utilizada habitualmente en la técnica. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se lleva a cabo habitualmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Además, a menos que el contexto requiera otra cosa, los términos en singular incluirán las pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. A lo largo de toda esta memoria descriptiva y las realizaciones, las palabras "tienen" y "comprenden", o variaciones tales como "tiene", "que tiene/n", "comprende" o "que comprende/n", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros. Todas las publicaciones y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan en su

totalidad por referencia. Aunque se citen en el presente documento diversos documentos, esta cita no constituye una admisión de que ninguno de estos documentos forme parte del conocimiento general en la técnica.

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

10 Además, "y/o", cuando se utiliza en el presente documento, debe considerarse una divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por tanto, la expresión "y/o" tal como se utiliza en una expresión como "A y/o B" en el presente documento pretende incluir "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B" (solo). Asimismo, la expresión "y/o", como se utiliza en una expresión como "A, B y/o C", pretende abarcar cada
15 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 donde se describen aspectos en el presente documento con el vocabulario "que comprende", también se proporcionan otros aspectos análogos descritos en términos de "que consiste en" y/o "que consiste
20 esencialmente en".

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica con la que se relaciona esta divulgación. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2.^a ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular
25 Biology, 3.^a ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Revisado, 2000, Oxford University Press, puede proporcionar a los expertos un diccionario general de muchos de los términos utilizados en esta divulgación.

30 Las unidades, prefijos y símbolos se indican en su forma aceptada del Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, las

secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación amino a carboxi. Los títulos 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 con mayor
5 precisión mediante referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

El término "de manera aproximada" o "aproximadamente" se utiliza en el presente documento para significar de manera aproximada, aproximadamente, alrededor o en las regiones de. Cuando el término "aproximadamente" se utiliza junto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo ampliando los límites por
10 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 indicado 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 $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$,
15 $\pm 1\%$, $\pm 0.9\%$, $\pm 0.8\%$, $\pm 0.7\%$, $\pm 0.6\%$, $\pm 0.5\%$, $\pm 0.4\%$, $\pm 0.3\%$, $\pm 0.2\%$, $\pm 0.1\%$, $\pm 0.05\%$ 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,
20 "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
25 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 ± 0.3 %. En algunas realizaciones, "aproximadamente" indica una desviación del valor numérico indicado de ± 0.1 %. En algunas realizaciones, "aproximadamente" indica una desviación del valor numérico indicado de ± 0.05 %. En algunas realizaciones, "aproximadamente" indica una desviación del valor numérico indicado de ± 0.01 %.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "ARN mensajero" o "ARNm" se refiere a un polinucleótido que codifica al menos un polipéptido. El ARNm, como se utiliza en el presente documento, abarca tanto ARN modificado como no modificado. El ARNm puede contener una o más regiones codificantes y no codificantes. Una región codificante se denomina alternativamente marco abierto de lectura (ORF). Las regiones no codificantes del ARNm incluyen la caperuza en 5', una región no traducida (UTR) en 5', una 3' UTR y una cola poli(A). El ARNm puede purificarse a partir de fuentes naturales, producirse utilizando sistemas de expresión recombinantes (por ejemplo, transcripción *in vitro*) y, opcionalmente, purificarse o sintetizarse químicamente.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "sitio antigénico Ø" o "epítipo del sitio Ø" para RSV se refiere a un sitio ubicado en el vértice del trímero F del RSV prefusión que comprende los restos de aminoácidos 62 a 69 y 196 a 209 de F del RSV de tipo silvestre (SEQ ID NO: 9). El epítipo del sitio Ø de F del RSV es un sitio de unión para anticuerpos que tienen especificidad para F del RSV prefusión, tal como D25 y AM14, y la unión de anticuerpos al epítipo del sitio Ø bloquea la unión del RSV a la superficie celular (véase, por ejemplo, McLellan *et al.*, Science, 340(6136): 1113-1117, 2013). El anticuerpo recombinante humano anti-RSV D25 (Creative Biolabs®; n.º de CAT: PABL-322) y el anticuerpo recombinante humano anti-RSV AM14 (Creative Biolabs®; n.º de CAT: PABL-321) están disponibles comercialmente.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "sitio antigénico Ø" o "epítipo del sitio Ø" para hMPV se refiere a un sitio ubicado en la forma prefusión del trímero F del hMPV. El epítipo del sitio Ø del hMPV es un sitio de unión para anticuerpos que tienen especificidad por F del hMPV prefusión.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "sitio antigénico Ø" o "epítipo del sitio Ø" para hPIV3 se refiere a un sitio ubicado en la forma prefusión del trímero F del hPIV3. El epítipo del sitio Ø del hPIV3 es un sitio de unión para anticuerpos que tienen especificidad por F del hPIV3 prefusión.

5 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "sitio antigénico V" o "epítipo del sitio V" se refiere a un sitio ubicado en la forma prefusión del trímero F del hMPV. El epítipo del sitio V es un sitio de unión para anticuerpos que tienen especificidad por F del hMPV prefusión.

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

 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "sustituciones de llenado de cavidades" se refiere a sustituciones hidrófobas genomanipuladas para llenar las cavidades presentes en el trímero F del RSV prefusión, el trímero F del hMPV prefusión o el trímero del hPIV3 prefusión.

15 Como se utilizan en el presente documento, las expresiones "proteína F del RSV" o "proteína F" con respecto al RSV se refieren a la proteína del RSV responsable de mediar en la fusión de la envoltura vírica y la membrana de la célula hospedadora durante la entrada del virus.

20 Como se utilizan en el presente documento, las expresiones "proteína F del hMPV" o "proteína F" con respecto al hMPV se refieren a la proteína del hMPV responsable de mediar en la fusión de la envoltura vírica y la membrana de la célula hospedadora durante la entrada del virus.

25 Como se utilizan en el presente documento, las expresiones "proteína F del hPIV3" o "proteína F" con respecto al hPIV3 se refieren a la proteína del hPIV3 responsable de mediar en la fusión de la envoltura vírica y la membrana de la célula hospedadora durante la entrada del virus.

30 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "polipéptido F del RSV" se refiere a un polipéptido que comprende al menos un epítipo de la proteína F.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "polipéptido F del hMPV" se refiere a un polipéptido que comprende al menos un epítopo de la proteína F del hMPV.

5 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "polipéptido F del hPIV3" se refiere a un polipéptido que comprende al menos un epítopo de la proteína F del hPIV3.

10 Como se utiliza en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de su longitud o modificación postraslacional (por ejemplo, glucosilación o fosforilación). "Polipéptido" se aplica a polímeros de aminoácidos que incluyen polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural, así como en los que uno o más restos de aminoácidos son un aminoácido no natural, por ejemplo, un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente. Un "resto" se refiere a un aminoácido o mimético de aminoácido incorporado a un polipéptido mediante un enlace amida o un mimético de enlace amida. Un polipéptido tiene un extremo amino terminal (N-terminal) y un extremo carboxi terminal (C-terminal). "Polipéptido" se utiliza indistintamente con péptido o proteína, y se utiliza en el presente documento para referirse a un polímero de restos aminoacídicos.

20 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "adición de glucanos" se refiere a la adición de mutaciones que introducen sitios de glucosilación no presentes en F del RSV de tipo silvestre, que pueden genomanipularse para aumentar la expresión de la construcción, aumentar la estabilidad de la construcción o bloquear epítopos compartidos entre la conformación de prefusión y posfusión. Una proteína modificada que comprenda adiciones de glucanos tendría más glucosilación y, por tanto, un mayor peso molecular. La adición de glucanos puede reducir el grado en que un polipéptido F del RSV genera anticuerpos contra la conformación de F posfusión del RSV.

30 Como se utiliza en el presente documento, un "dominio *foldon*" se refiere a un dominio de trimerización de fibrina T4.

Como se utiliza en el presente documento, un "péptido señal" o "secuencia señal" se refiere a un péptido de aproximadamente 16-30

aminoácidos de longitud presente en el extremo amino o en el extremo carboxilo de un polipéptido que funciona para traslocar el polipéptido al sistema secretor en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi.

Como se utiliza en el presente documento, una "secuencia marcadora" o "marcador de afinidad" se refiere a una secuencia polipeptídica que puede usarse para purificar un polipéptido o una proteína que comprende la secuencia identificadora. Las secuencias marcadoras incluyen, por ejemplo, marcadores de polihistidina (p. ej., hexahistidina (marcador de 6x His), octahistidina (marcador de 8x His), etc.), glutatión-S-transferasa (GST), FLAG, péptido de unión a estreptavidina (SBP, del inglés *streptavidin-binding peptide*), estreptavidina II, proteína de unión a maltosa (MBP, del inglés *maltose-binding protein*), proteína de unión a calmodulina (CBP, del inglés *calmodulin-binding protein*), dominio de unión a quitina (CBD, del inglés *chitin-binding domain*), proteína S de ARNasa A, hemaglutinina (HA), c-Myc y similares.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "sustituciones estabilizadoras intraprotómicas" se refiere a sustituciones de aminoácidos en F del RSV, F del hMPV o F del hPIV3 que estabilizan la conformación prefusión mediante la estabilización de la interacción dentro de un protómero del trímero F del RSV, dentro de un protómero del trímero F del hMPV o dentro de un protómero del trímero de hPIV3, respectivamente.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "sustituciones estabilizadoras entre protómeros" se refiere a sustituciones de aminoácidos en F del RSV, F del hMPV o F del hPIV3 que estabilizan la conformación prefusión mediante la estabilización de la interacción de los protómeros del trímero F del RSV entre sí, los protómeros de F del hMPV entre sí o los protómeros del trímero F del hPIV3 entre sí, respectivamente.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "escisión por proteasas" se refiere a la proteólisis (a veces también denominada "recorte") de restos susceptibles (por ejemplo, lisina o arginina) en una secuencia polipeptídica. Los sitios de escisión por proteasas incluyen sitios de escisión por proteasas víricas, tales como, por ejemplo, un sitio de escisión por proteasas F0 del hMPV, un sitio de escisión por proteasas F0 del RSV, un sitio de escisión por

proteasas 3C del rinovirus humano (HRV-3C) y un sitio de escisión por proteasas F0 del hPIV3.

Como se utiliza en el presente documento, el término "posfusión" con respecto a F del RSV, F del hMPV y F del hPIV3, se refiere a una conformación estable de F del RSV, F del hMPV y F del hPIV3 que se produce después de la fusión del virus y las membranas celulares.

Como se utiliza en el presente documento, el término "prefusión" con respecto a F del RSV, F del hMPV y F del hPIV3, se refiere a una conformación de F del RSV, F del hMPV y F del hPIV3 que se adopta antes de la interacción virus-célula.

Como se utiliza en el presente documento, el término "protómero" se refiere a una unidad estructural de una proteína oligomérica. En el caso de F del RSV, una unidad individual del trímero de F del hMPV es un protómero. En el caso de F del RSV, una unidad individual del trímero de F del hMPV es un protómero. En el caso de F del hMPV, una unidad individual del trímero de F del hMPV es un protómero. En el caso de F del hPIV3, una unidad individual del trímero de F del hPIV3 es un protómero.

Como se utiliza en el presente documento, el término "N-glucano" se refiere a una cadena de sacárido unida a una proteína en el nitrógeno amida de un resto de N (asparagina) de la proteína. Como tal, un N-glucano se forma mediante el proceso de N-glucosilación. Este glucano puede ser un polisacárido.

Como se utiliza en el presente documento, el término "glucosilación" se refiere a la adición de una unidad de sacárido a una proteína.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "respuesta inmunitaria" se refiere a una respuesta de una célula del sistema inmunitario, tal como un linfocito B, linfocito T, célula dendrítica, macrófago o leucocito polimorfonuclear, a un estímulo, tal como un antígeno o vacuna. Una respuesta inmunitaria puede incluir cualquier célula del cuerpo que intervenga en una respuesta de defensa del hospedador, que incluye, por ejemplo, una célula epitelial que secreta un interferón o una citocina. Una respuesta inmunitaria incluye, pero no se limita a, una respuesta inmunitaria innata y/o adaptativa.

Como se utiliza en el presente documento, una "respuesta inmunitaria protectora" se refiere a una respuesta inmunitaria que protege a un sujeto frente a una infección (p. ej., previene la infección o previene el desarrollo de la enfermedad asociada con la infección). Los métodos de medición de las
5 respuestas inmunitarias incluyen, por ejemplo, proliferación y/o actividad de linfocitos (tales como linfocitos B o T), secreción de citocinas o quimiocinas, inflamación, producción de anticuerpos y similares.

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

10 Como se utiliza en el presente documento, un "antígeno" se refiere a un agente que desencadena una respuesta inmunitaria y/o un agente al que se une un receptor de linfocitos T (p. ej., cuando es presentado por una molécula MHC) o un anticuerpo (p. ej., producido por un linfocito B) tras su exposición en o administración a un organismo. En algunas realizaciones, un antígeno
15 desencadena una respuesta humoral (p. ej., que incluye la producción de anticuerpos específicos de antígeno) en un organismo. De forma alternativa, o adicional, en algunas realizaciones, un antígeno desencadena una respuesta celular (p. ej., que involucra linfocitos T cuyos receptores interactúan específicamente con el antígeno) en un organismo. Un antígeno concreto puede
20 desencadenar 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 de organismo diana. En algunas realizaciones, un antígeno desencadena una respuesta inmunitaria en al menos aproximadamente un 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%,
25 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de los miembros de una especie de organismo diana. En algunas realizaciones, un antígeno se une a un anticuerpo y/o receptor de linfocitos T y puede o no inducir una respuesta fisiológica concreta en un organismo. En algunas realizaciones, por ejemplo, un antígeno puede unirse a un anticuerpo y/o a un receptor de
30 linfocitos T *in vitro*, independientemente de que esa interacción ocurra 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 RSV, los polipéptidos del hMPV y los polipéptidos del hPIV3 codificados por ARNm como se describe en el presente documento.

Como se utiliza 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) en la cual se adsorbe el antígeno; una emulsión de agua en aceite o de 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 mejorar aún más la antigenicidad. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores (por ejemplo, un motivo CpG) también se pueden utilizar como adyuvantes (por ejemplo, véanse las patentes estadounidenses n.º 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 del receptor de tipo Toll (TLR) y moléculas coestimuladoras.

Como se utiliza en el presente documento, un "polipéptido antigénico" se refiere a un polipéptido que comprende todo o parte de una secuencia de aminoácidos del RSV de longitud suficiente para que la molécula sea antigénica con respecto al RSV, todo o parte de una secuencia de aminoácidos del hMPV de longitud suficiente para que la molécula sea antigénica con respecto al hMPV, o toda o parte de una secuencia de aminoácidos del hPIV3 de longitud suficiente para que la molécula sea antigénica con respecto al hPIV3.

Como se utiliza 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 bovino, un primate y/o un cerdo). En algunas realizaciones, un sujeto puede ser un animal transgénico, un animal genomodificado y/o un clon. En determinadas realizaciones, el sujeto es un adulto, un adolescente o un bebé. En algunas

realizaciones, se utilizan los términos "individuo" o "paciente" y se pretende que sean intercambiables con "sujeto". En determinadas realizaciones ilustrativas, el sujeto es un recién nacido prematuro (por ejemplo, con una edad gestacional inferior a 37 semanas), un recién nacido (por ejemplo, de 0 a 27 días de edad),
5 un bebé o un niño pequeño (por ejemplo, de 28 días a 23 meses de edad), un niño (por ejemplo, de 2 a 11 años de edad), un adolescente (por ejemplo, de 12 a 17 años de edad), un adulto (por ejemplo, de 18 a 50 años o de 18 a 64 años de edad) o un persona mayor (por ejemplo, de 65 años o más). En realizaciones ilustrativas, el sujeto tiene entre 18 y 50 años de edad. En otras realizaciones
10 ilustrativas, el sujeto es un adulto mayor (por ejemplo, un adulto de 60 años o más).

Como se utiliza en el presente documento, el término "vacunación" o "vacunar" se refiere a la administración de una composición destinada a generar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, a un agente patógeno. La vacunación
15 se puede administrar antes, durante y/o después de la exposición a un agente patógeno, y/o al desarrollo de uno o más síntomas y, en algunas realizaciones, antes, durante y/o poco después de la exposición al agente patógeno. En algunas realizaciones, la vacunación incluye varias administraciones, separadas de forma apropiada en el tiempo, de una composición de vacuna.

20 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 ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos determinada, respectivamente (una secuencia de referencia).

La "identidad secuencial" entre dos secuencias de ácido nucleico indica el
25 porcentaje de nucleótidos que son idénticos entre las secuencias. La "identidad secuencial" entre dos secuencias de aminoácidos indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias.

Se pretende que los términos "% idénticos", "% de identidad" o términos similares se refieran, en particular, al porcentaje de nucleótidos o aminoácidos
30 que son idénticos en una alineación óptima entre las secuencias que se van a comparar. Dicho porcentaje es puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias pueden estar distribuidas, pero no necesariamente, de forma

aleatoria a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se han de comparar. Las comparaciones de dos secuencias habitualmente se llevan a cabo comparando dichas secuencias, después de una alineación óptima, con respecto a un segmento o "ventana de comparación", para identificar regiones locales de las secuencias correspondientes. La alineación óptima para una comparación puede realizarse manualmente o con ayuda del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482, con ayuda del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, con ayuda del algoritmo de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 2444, o con ayuda de programas informáticos que utilizan dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin 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 que se van a comparar, dividiendo este número por el número de posiciones comparadas (p. ej., el número de posiciones en la secuencia de referencia) y multiplicando este resultado por 100.

En algunas realizaciones, se proporciona el grado de identidad para una región que es al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 90% o aproximadamente un 100% de la longitud entera de la secuencia de referencia. Por ejemplo, si la secuencia de ácido nucleico de referencia consiste en 200 nucleótidos, se proporciona el grado de identidad para al menos aproximadamente 100, al menos 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, se proporciona el grado de identidad para la longitud entera de la secuencia de referencia.

Las secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos que tienen un grado particular 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 secuencia de aminoácidos que tiene un grado particular de identidad con una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos dada es funcionalmente equivalente a dicha secuencia dada.

Como se utiliza 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. ARN

Las vacunas de la presente divulgación pueden comprender al menos dos ácidos ribonucleicos (ARN), cada uno de los cuales comprende un ORF que codifica un polipéptido antigénico de proteína F recombinante, tal como un antígeno de proteína F del RSV, un antígeno de proteína F del hMPV o un antígeno de proteína del hPIV3. En determinadas realizaciones, los ARN son ARN mensajeros (ARNm), cada uno de los cuales comprende un ORF que codifica un antígeno de proteína F del RSV, un antígeno de proteína F del hMPV o un antígeno del hPIV3. En determinadas realizaciones, los ARN (p. ej., ARNm) comprenden, además, al menos una 5' UTR, 3' UTR, una cola poli(A) y/o una caperuza en 5'.

II. A. Caperuza en 5'

Una caperuza en 5' en el ARNm puede proporcionar resistencia a las nucleasas que se encuentran en la mayoría de las células eucariotas y promover la eficacia de la traducción. Se conocen varios tipos de caperuzas en 5'. Una caperuza de 7-metilguanosina (también denominada "m7G" o "Cap-0") comprende una guanosina que está unida a través de un enlace trifosfato 5' – 5' al primer nucleótido transcrito.

Normalmente, se añade una caperuza en el extremo 5' de la siguiente manera: primero, una fosfatasa terminal de ARN elimina uno de los grupos fosfato terminales del nucleótido en 5', dejando dos fosfatos terminales; después se añade guanosín trifosfato (GTP) a los fosfatos terminales a través de una

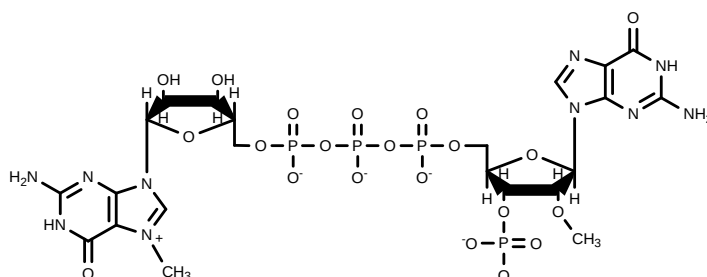
guanilil transferasa, lo que produce un enlace trifosfato 5'5'5; y después, una metiltransferasa metila el nitrógeno 7 de la guanina. Ejemplos de estructuras de caperuza incluyen, pero sin limitación, m7G(5')ppp, (5'(A,G(5')ppp(5')A y G(5')ppp(5')G. Se describen estructuras de caperuza adicionales en las
5 publicaciones de EE. UU. n.º US 2016/0032356 y US 2018/0125989, que se incorporan en el presente documento como referencia.

La protección en 5' de los polinucleótidos puede completarse de forma simultánea durante la reacción de transcripción *in vitro* utilizando los siguientes análogos químicos de la caperuza de ARN para generar la estructura de
10 caperuza en 5' de guanosina de acuerdo con los protocolos del fabricante: 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G (la caperuza 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; m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG (New England BioLabs, Ipswich, MA; TriLink Biotechnologies). La protección en 5' del ARN
15 modificado se puede completar postranscripcionalmente con una enzima de protección del virus de la variolovacuna para generar la estructura Cap 0: m7G(5')ppp(5')G. La estructura Cap 1 se puede generar tanto con la enzima de protección del virus de la variolovacuna como con una 2'-O metiltransferasa para generar: m7G(5')ppp(5')G-2'-O-metilo. La estructura Cap 2 se puede generar a
20 partir de la estructura Cap 1 seguida de la 2'-O-metilación del antepenúltimo nucleótido en 5' utilizando una 2'-O metiltransferasa. La estructura Cap 3 se puede generar a partir de la estructura Cap 2 seguida de la 2'-O-metilación del preantepenúltimo nucleótido en 5' utilizando una 2'-O metiltransferasa.

En determinadas realizaciones, el ARNm de la divulgación comprende
25 una caperuza en 5' seleccionada del grupo que consiste en 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G (la caperuza 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 determinadas realizaciones, el ARNm de la divulgación comprende
30 una caperuza en 5' de:

5



II. B. Región no traducida (UTR)

En algunas realizaciones, el ARNm de la divulgación incluye una región no traducida (UTR) en 5' y/o en 3'. En el ARNm, la UTR en 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 en 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 en 5' que incluye uno o más elementos que afectan a la estabilidad o traducción de un ARNm. En algunas realizaciones, una UTR en 5' puede tener una longitud de aproximadamente 10 a 5,000 nucleótidos. En algunas realizaciones, una UTR en 5' puede tener una longitud de aproximadamente 50 a 500 nucleótidos. En algunas realizaciones, la UTR en 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 en 3' que comprende una o más de una señal de poliadenilación, un sitio de unión para proteínas que afectan a la estabilidad de la ubicación del ARNm en una célula, o uno o más sitios de unión para miARN. En algunas realizaciones, una UTR en 3' puede tener una longitud de 50 a 5,000 nucleótidos o más. En algunas realizaciones, una UTR en 3' puede tener una longitud de 50 a 1,000 nucleótidos o más. En algunas realizaciones, la UTR en 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 en 5' o en 3' que procede de un gen distinto del codificado por el transcrito de ARNm (es decir, la UTR es una UTR heteróloga).

En determinadas realizaciones, las secuencias de UTR en 5' y/o en 3' pueden proceder 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 de UTR en 5' puede incluir una secuencia parcial de un gen 1 temprano inmediato (IE1) de CMV, o un fragmento del mismo, para mejorar la resistencia a nucleasas y/o mejorar la semivida del ARNm. También se contempla la inclusión de una secuencia que codifica la hormona del crecimiento humano (hGH), o un fragmento de la misma, en el extremo 3' o región no traducida del ARNm. Generalmente, estas modificaciones mejoran la estabilidad y/o las propiedades farmacocinéticas (por ejemplo, semivida) del ARNm en relación con sus homólogos no modificados, e incluyen, por ejemplo, modificaciones realizadas para mejorar dicha resistencia del ARNm a la digestión con nucleasas *in vivo*.

UTR en 5' ilustrativas incluyen una secuencia procedente de un gen 1 temprano inmediato (IE1) de CMV (Publicaciones de los EE. UU. n.º 2014/0206753 y 2015/0157565, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento como referencia), o la secuencia GGGAUCCUACC (SEQ ID NO: 18 (Publicación de los EE. UU. n.º 2016/0151409, incorporada en el presente documento como referencia).

En diversas realizaciones, la UTR en 5' puede proceder de la UTR en 5' de un gen TOP. Los genes TOP se caracterizan normalmente por la presencia de un cordón de oligopirimidina 5'-terminal (TOP). 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 de tejido. En determinadas realizaciones, la UTR en 5' que procede de la UTR en 5' de un gen TOP carece del motivo TOP en 5' (el cordón de oligopirimidina) (p. ej., publicaciones de los EE. UU. n.º 2017/0029847, 2016/0304883, 2016/0235864 y 2016/0166710, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento como referencia).

En determinadas realizaciones, la UTR en 5' procede de un gen de la proteína ribosomal Large 32 (L32) (publicación de EE. UU. n.º 2017/0029847, mencionada anteriormente).

5 En determinadas realizaciones, la UTR en 5' procede de la UTR en 5' de un gen de la hidroxisteroide (17-b) deshidrogenasa 4 (HSD17B4) (Publicación de EE. UU. n.º 2016/0166710, mencionada anteriormente).

En determinadas realizaciones, la UTR en 5' procede de la UTR en 5' de un gen ATP5A1 (Publicación de EE. UU. n.º 2016/0166710, mencionada anteriormente).

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

En algunas realizaciones, la 5' UTR comprende una secuencia de ácido nucleico de
GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAA
15 GACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAA
CGCGGAUCCCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG (SEQ ID NO: 7).

En algunas realizaciones, la 3' UTR comprende una secuencia de ácido nucleico de
20 CGGGUGGCAUCCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUGGA
AGUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGC
AUC (SEQ ID NO: 8).

La 5' UTR y la 3' UTR se describen con más detalle en la publicación internacional n.º WO 2012/075040, incorporada en el presente documento como
25 referencia.

II. C. Cola poliadenilada

Como se utilizan en el presente documento, las expresiones "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
30 poli(A) puede conferir estabilidad al ARNm y protegerlo frente a la 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 determinadas 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 poli(A) 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 determinadas realizaciones, la cola de poli(A) comprende la secuencia:

10 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAUAUGACUAAAAAAAAAAAA
AA
AAAAA (SEQ ID NO: 19).

La "cola de poli(A)", como se utiliza en el presente documento, normalmente se refiere a ARN. Sin embargo, en el contexto de la divulgación, la expresión también se refiere a 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, 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 tener 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 del ARN *in vitro*. En determinadas realizaciones, la cola de poli(A) se obtiene *in vitro* mediante métodos comunes de síntesis química sin transcribirse a partir de un molde de ADN. En diversas realizaciones, las colas de poli(A) se generan mediante poliadenilación enzimática del ARN (después de la transcripción del ARN *in vitro*) utilizando kits de poliadenilación comercializados y los protocolos correspondientes o, como alternativa, utilizando

poli(A)polimerasas inmovilizadas, p. ej., mediante métodos y medios como los que se describen en la publicación internacional WO 2016/174271.

El ácido nucleico puede comprender una cola de poli(A) obtenida mediante poliadenilación enzimática, en donde la mayoría de las moléculas de
5 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) procedente de un molde de ADN y puede comprender adicionalmente
10 al menos una cola de poli(A) adicional generada mediante poliadenilación enzimática, por ejemplo, como se describe en la publicación internacional n.º WO 2016/091391.

En determinadas realizaciones, el ácido nucleico comprende al menos una señal de poliadenilación.

15 En diversas realizaciones, el ácido nucleico puede comprender al menos una secuencia de poli(C).

La expresión "secuencia de poli(C)", Como se utiliza en el presente documento, pretende ser una secuencia de nucleótidos de citosina de hasta aproximadamente 200 nucleótidos de citosina. En algunas realizaciones, la
20 secuencia de poli(C) comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 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
25 nucleótidos de citosina. En algunas realizaciones, la secuencia de poli(C) comprende aproximadamente 30 nucleótidos de citosina.

II. D. Modificación química

El ARNm divulgado en el presente documento puede estar modificado o no modificado. En algunas realizaciones, el ARNm puede comprender al menos
30 una modificación química. En algunas realizaciones, el ARNm divulgado en el presente documento puede contener una o más modificaciones que normalmente mejoran la estabilidad del ARN. Las modificaciones ilustrativas

pueden incluir modificaciones de la estructura principal, modificaciones de azúcar o modificaciones de bases. En algunas realizaciones, el ARNm divulgado puede sintetizarse a partir de nucleótidos de origen natural y/o análogos de nucleótidos (nucleótidos modificados) que incluyen, pero no se limitan a, purinas (adenina (A) y guanina (G)) o pirimidinas (timina (T), citosina (C) y uracilo (U)). En determinadas realizaciones, el ARNm divulgado se puede sintetizar a partir de análogos de nucleótidos modificados o derivados de purinas y pirimidinas, tales 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-2-tio-uracilo, 5-metil-uracilo, éster metílico del ácido N-uracil-5-oxiacético, 5-metilaminometil-uracilo, 5-metoxiaminometil-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-deazaguanosina, 5-metilcitosina e inosina.

En algunas realizaciones, el ARNm divulgado puede comprender al menos una modificación química que incluye, pero sin limitación, pseudouridina, N1-metilpseudouridina, 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitosina, 2-tio-l-metil-1-deaza-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-metiluridina.

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

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

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

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

La preparación de análogos de este tipo se describe, p. ej., en la patente de los EE. UU. n.º 4,373,071, la patente de los EE. UU. n.º 4,401.796, la patente de los EE. UU. n.º 4,415,732, la patente de los EE. UU. n.º 4,458,066, la patente de los EE. UU. n.º 4,500,707, la patente de los EE. UU. n.º 4,668,777, la patente de los EE. UU. n.º 4,973,679, la patente de los EE. UU. n.º 5,047,524, la patente de los EE. UU. n.º 5,132,418, la patente de los EE. UU. n.º 5,153,319, la patente de los EE. UU. n.º 5,262,530 y la patente de los EE. UU. n.º 5,700,642.

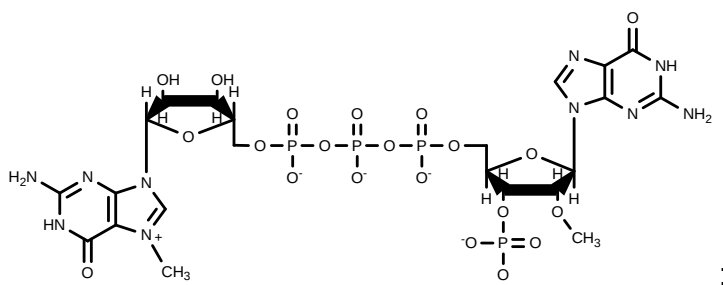
II. E. Síntesis de ARNm

Los ARNm divulgados en el presente documento pueden sintetizarse de acuerdo con cualquiera de diversidad de métodos. Por ejemplo, los ARNm de acuerdo con la presente divulgación pueden sintetizarse a través de transcripción *in vitro* (IVT, por sus siglas en inglés). Algunos métodos para la transcripción *in vitro* se describen, p. ej., en Geall *et al.* (2013) *Semin. Immunol.* 25(2): 152-159; Brunelle *et al.* (2013) *Methods Enzymol.* 530:101-14. Resumiendo, la IVT se realiza normalmente con un molde de ADN lineal o circular que contiene un promotor, una mezcla de trifosfatos de ribonucleótido, un sistema de tampón que puede incluir DTT e iones de magnesio, un inhibidor apropiado de ARN·polimerasa (p. ej., ARN·polimerasa de T3, T7 o SP6), desoxirribonucleasa I, pirofosfatasa y/o ribonucleasa. Las condiciones exactas pueden variar según la aplicación específica. La presencia de estos reactivos es generalmente indeseable en un producto de ARNm final 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. Si bien el ARNm proporcionado a partir de reacciones de transcripción *in vitro* puede ser deseable en algunas realizaciones, se pueden utilizar otras fuentes de ARNm de acuerdo con la presente divulgación, que incluyen ARNm natural producido a partir de bacterias, hongos, plantas y/o animales.

En determinadas realizaciones, al menos un ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

(i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:



(ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;

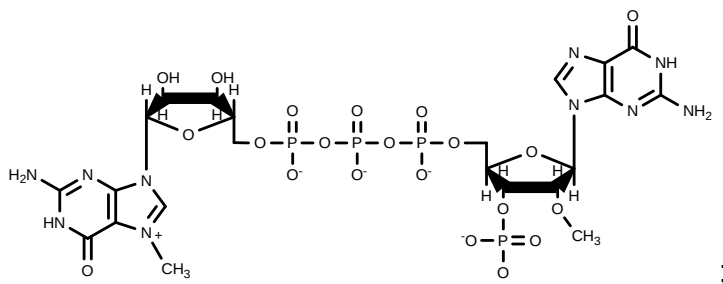
(iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4, 5 o 6;

(iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y

(v) una cola poli(A).

En determinadas realizaciones, al menos un ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

(i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:



(ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;

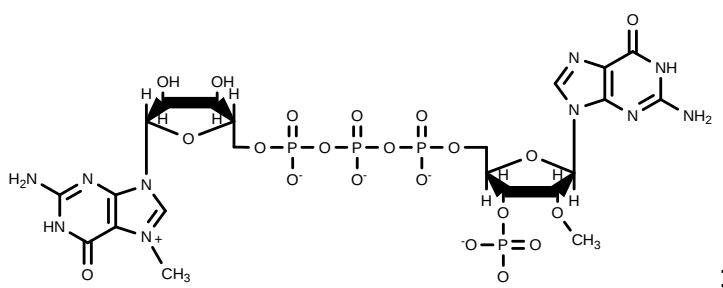
- (iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4;
- (iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y
- (v) una cola poli(A).

5

En determinadas realizaciones, al menos un ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

- (i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:

10



15

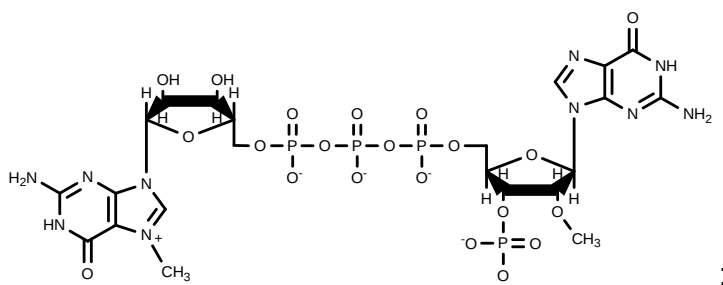
- (ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;
- (iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 5;
- (iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y
- (v) una cola poli(A).

20

En determinadas realizaciones, al menos un ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

- (i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:

25



30

- (ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;

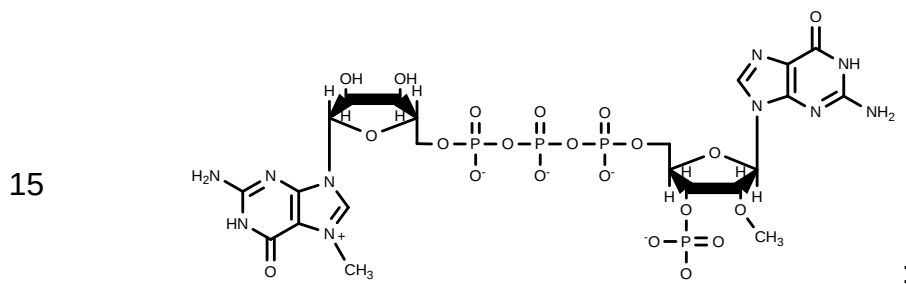
(iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 6;

(iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y

5 (v) una cola poli(A).

En determinadas realizaciones, la composición comprende al menos dos ARNm, en donde cada uno de los al menos dos ARNm comprende un marco abierto de lectura (ORF) que codifica un polipéptido antigénico de proteína F recombinante, en donde al menos uno de los ARNm comprende los siguientes
10 elementos estructurales:

(i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:



(ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;

20 (iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4, 5 o 6;

(iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y

(v) una cola poli(A);

25 en donde el ARNm se formula en una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende:

GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 en una proporción molar del 40 %;

DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %;

colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y

30 DOPE en una proporción molar del 30 %.

En determinadas realizaciones, la composición comprende al menos dos ARNm, en donde cada uno de los al menos dos ARNm comprende un ORF que

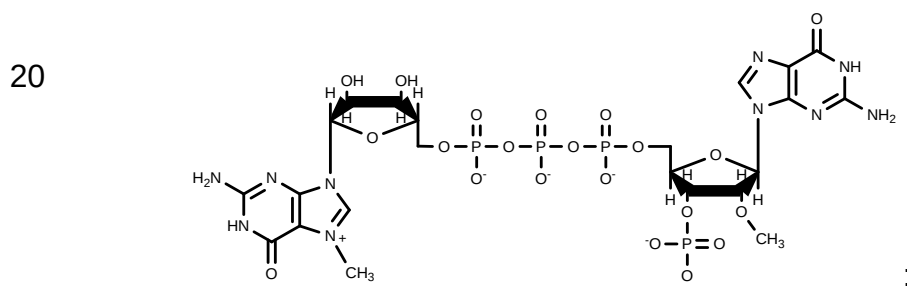
- (ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;
- (iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 5;
- 5 (iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y
- (v) una cola poli(A);

en donde el ARNm se formula en una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende:

- 10 GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 en una proporción molar del 40 %;
- DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %;
- colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y
- DOPE en una proporción molar del 30 %.

En determinadas realizaciones, la composición comprende al menos dos
15 ARNm, en donde cada uno de los al menos dos ARNm comprende un ORF que codifica un polipéptido antigénico de proteína F recombinante, en donde al menos uno de los ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

- (i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:



- 25 (ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;
- (iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 6;
- (iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y
- 30 (v) una cola poli(A);

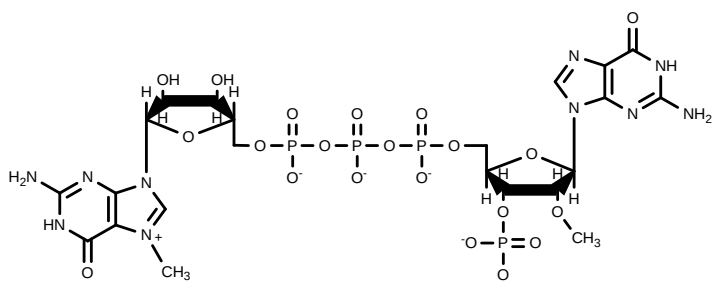
en donde el ARNm se formula en una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende:

GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 en una proporción molar del 40 %;
 DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %;
 colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y
 DOPE en una proporción molar del 30 %.

- 5 En determinadas realizaciones, la composición comprende al menos dos ARNm, en donde cada uno de los al menos dos ARNm comprende un ORF que codifica un polipéptido antigénico de proteína F recombinante, en donde al menos uno de los ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

(i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:

10



15

- (ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;
 (iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4, 5 o 6;
 (iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y
 (v) una cola poli(A);

20

en donde el ARNm se formula en una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende:

25

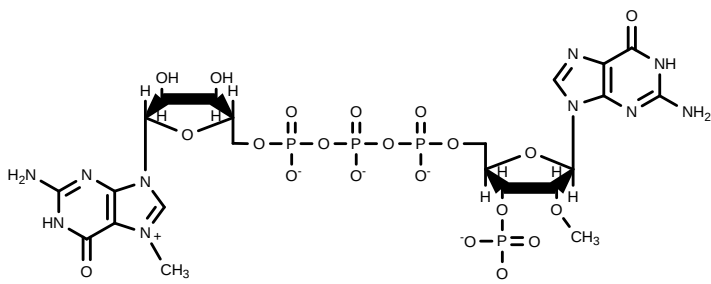
cKK-E10 a una proporción molar del 40 %;
 DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %;
 colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y
 DOPE en una proporción molar del 30 %.

30

En determinadas realizaciones, la composición comprende al menos dos ARNm, en donde cada uno de los al menos dos ARNm comprende un ORF que codifica un polipéptido antigénico de proteína F recombinante, en donde al menos uno de los ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

(i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:

5



(ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;

(iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4;

10

(iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y

(v) una cola poli(A);

en donde el ARNm se formula en una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende:

15

cKK-E10 a una proporción molar del 40 %;

DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %;

colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y

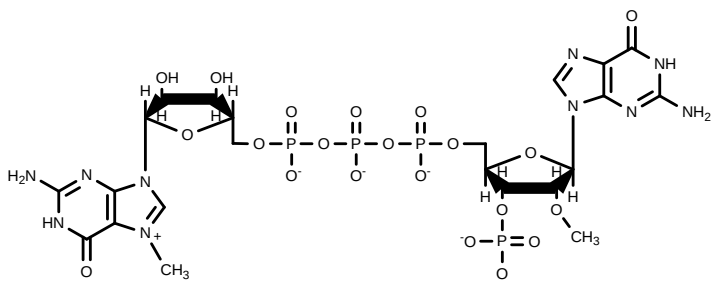
DOPE en una proporción molar del 30 %.

20

En determinadas realizaciones, la composición comprende al menos dos ARNm, en donde cada uno de los al menos dos ARNm comprende un ORF que codifica un polipéptido antigénico de proteína F recombinante, en donde al menos uno de los ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

(i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:

25



30

(ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;

(iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 5;

(iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y

5 (v) una cola poli(A);

en donde el ARNm se formula en una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende:

cKK-E10 a una proporción molar del 40 %;

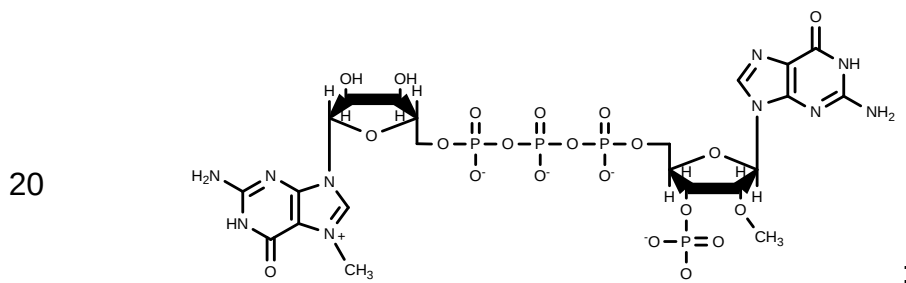
DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %;

10 colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y

DOPE en una proporción molar del 30 %.

En determinadas realizaciones, la composición comprende al menos dos ARNm, en donde cada uno de los al menos dos ARNm comprende un ORF que codifica un polipéptido antigénico de proteína F recombinante, en donde al
15 menos uno de los ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

(i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:



(ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;

25 (iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 6;

(iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y

(v) una cola poli(A);

30 en donde el ARNm se formula en una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende:

cKK-E10 a una proporción molar del 40 %;

DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %;

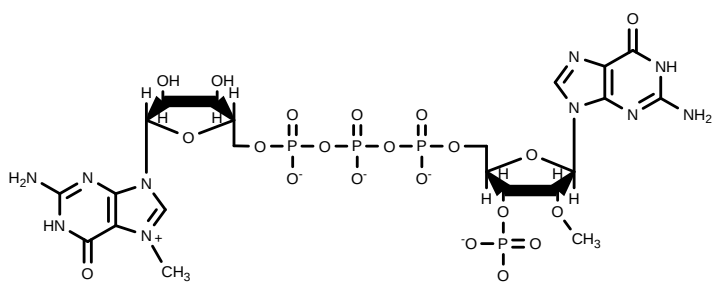
colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y

DOPE en una proporción molar del 30 %.

En determinadas realizaciones, la composición comprende al menos dos ARNm, en donde cada uno de los al menos dos ARNm comprende un ORF que
5 codifica un polipéptido antigénico de proteína F recombinante, en donde al menos uno de los ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

(i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:

10



(ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido
15 nucleico de SEQ ID NO: 7;

(iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido
nucleico de SEQ ID NO: 4, 5 o 6;

(iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido
nucleico de SEQ ID NO: 8; y

20

(v) una cola poli(A);

en donde el ARNm se formula en una nanopartícula lipídica (LNP) que
comprende:

IM-001 en una proporción molar del 40 %;

DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %;

25

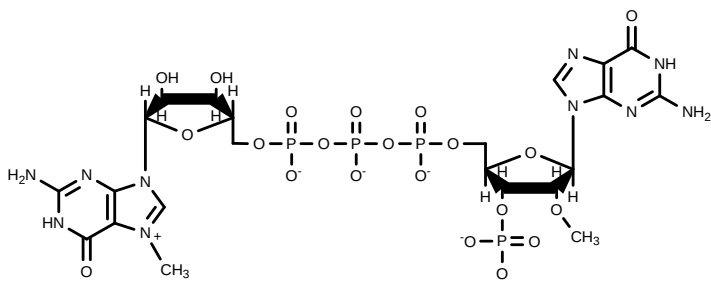
colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y

DOPE en una proporción molar del 30 %.

En determinadas realizaciones, la composición comprende al menos dos ARNm, en donde cada uno de los al menos dos ARNm comprende un ORF que
30 codifica un polipéptido antigénico de proteína F recombinante, en donde al menos uno de los ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

(i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:

5



(ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;

(iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4;

10

(iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y

(v) una cola poli(A);

en donde el ARNm se formula en una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende:

15

IM-001 en una proporción molar del 40 %;

DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %;

colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y

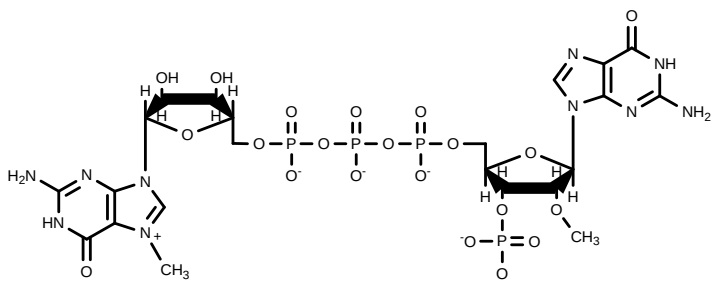
DOPE en una proporción molar del 30 %.

20

En determinadas realizaciones, la composición comprende al menos dos ARNm, en donde cada uno de los al menos dos ARNm comprende un ORF que codifica un polipéptido antigénico de proteína F recombinante, en donde al menos uno de los ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

(i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:

25



30

(ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;

(iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 5;

(iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y

5 (v) una cola poli(A);

en donde el ARNm se formula en una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende:

IM-001 en una proporción molar del 40 %;

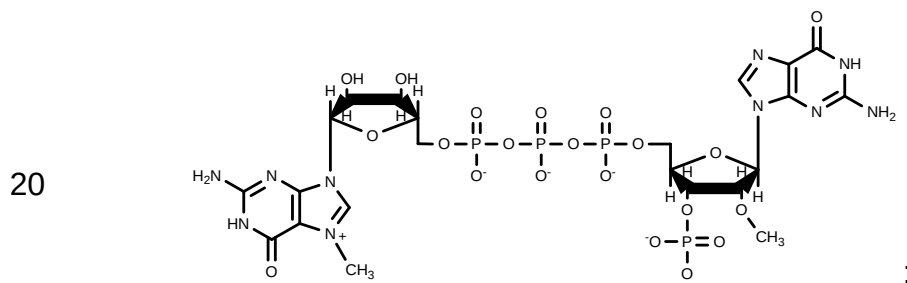
DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %;

10 colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y

DOPE en una proporción molar del 30 %.

En determinadas realizaciones, la composición comprende al menos dos ARNm, en donde cada uno de los al menos dos ARNm comprende un ORF que codifica un polipéptido antigénico de proteína F recombinante, en donde al
15 menos uno de los ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

(i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:



(ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;

25 (iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 6;

(iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y

(v) una cola poli(A);

30 en donde el ARNm se formula en una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende:

IM-001 en una proporción molar del 40 %;

DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %;

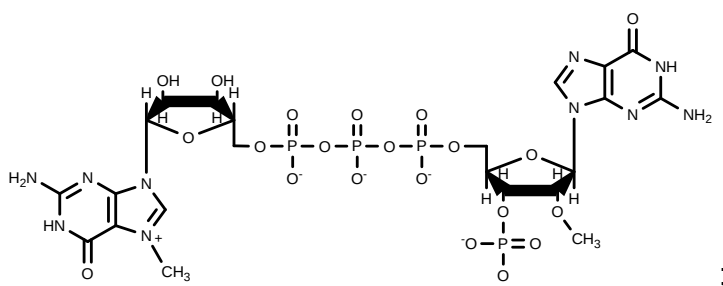
colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y

DOPE en una proporción molar del 30 %.

En determinadas realizaciones, la composición comprende al menos dos ARNm, en donde cada uno de los al menos dos ARNm comprende un ORF que
5 codifica un polipéptido antigénico de proteína F recombinante, en donde al menos uno de los ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

(i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:

10



(ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido
15 nucleico de SEQ ID NO: 7;

(iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido
nucleico de SEQ ID NO: 4, 5 o 6;

(iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido
nucleico de SEQ ID NO: 8; y

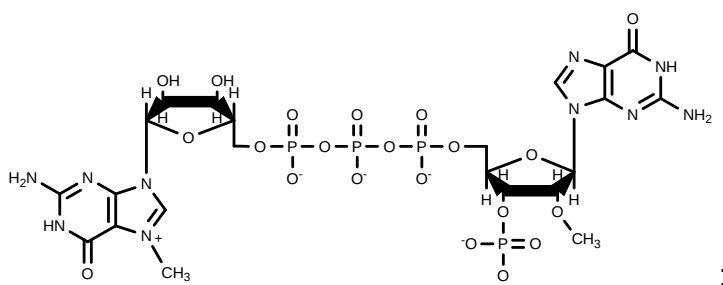
20 (v) una cola poli(A);

en donde el ARNm se formula en una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, IM-001, OF-02 o cKK-E10.

En determinadas realizaciones, la composición comprende al menos dos ARNm, en donde cada uno de los al menos dos ARNm comprende un ORF que
25 codifica un polipéptido antigénico de proteína F recombinante, en donde al menos uno de los ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

(i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:

30



(ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;

(iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 4;

5 (iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y

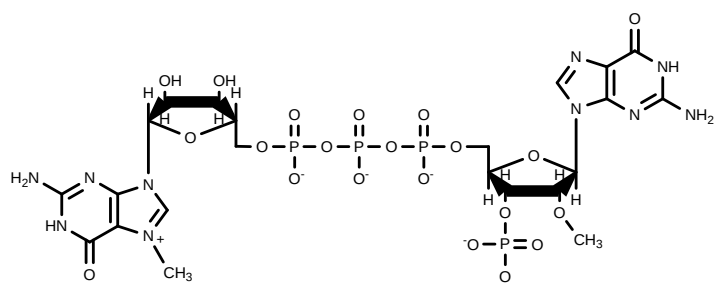
(v) una cola poli(A);

en donde el ARNm se formula en una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, IM-001. OF-02 o cKK-E10.

10 En determinadas realizaciones, la composición comprende al menos dos ARNm, en donde cada uno de los al menos dos ARNm comprende un ORF que codifica un polipéptido antigénico de proteína F recombinante, en donde al menos uno de los ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

(i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:

15



20

(ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;

(iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 5;

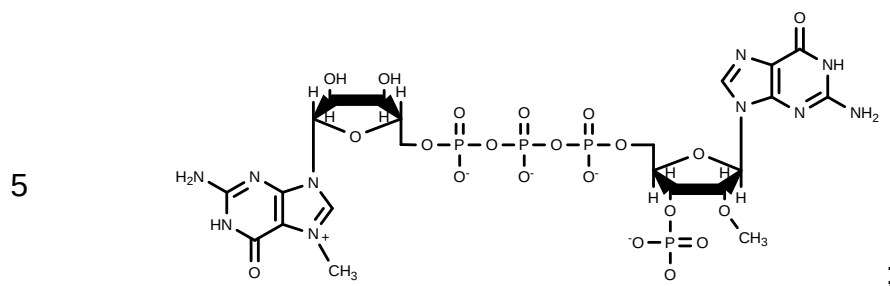
25 (iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y

(v) una cola poli(A);

en donde el ARNm se formula en una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, IM-001. OF-02 o cKK-E10.

30 En determinadas realizaciones, la composición comprende al menos dos ARNm, en donde cada uno de los al menos dos ARNm comprende un ORF que codifica un polipéptido antigénico de proteína F recombinante, en donde al menos uno de los ARNm comprende los siguientes elementos estructurales:

(i) una caperuza en 5' con la siguiente estructura:



(ii) una región no traducida en 5' (5' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7;

10 (iii) una región codificante de proteína que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 6;

(iv) una región no traducida en 3' (3' UTR) que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8; y

(v) una cola poli(A);

15 en donde el ARNm se formula en una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, IM-001, OF-02 o cKK-E10.

En determinadas realizaciones, la cola de poli(A) tiene una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 nucleótidos de adenosina.

III. Proteína F del RSV

20 El RSV es un virus de ARN monocatenario de sentido negativo que pertenece a la familia Pneumoviridae. El RSV puede provocar infección de las vías respiratorias. El RSV es un virus con envoltura con una glucoproteína (proteína G), una pequeña proteína hidrófoba (proteína SH, del inglés *small hydrophobic*) y una proteína de fusión (proteína F) en la superficie.

25 La proteína F del RSV es responsable de la fusión de las membranas víricas y de la célula hospedadora y adopta al menos tres conformaciones (conformaciones prefusión, intermedia y posfusión). En la conformación prefusión (prefusión, Pre-F), la proteína F existe en forma trimérica con el sitio antigénico principal Ø expuesto. El sitio Ø sirve como diana principal de los anticuerpos neutralizantes producidos por sujetos infectados por el RSV (véase, Coultas *et al.*, Thorax. 74: 986-993. 2019; McLellan *et al.*, Science. 340(6136): 1113-7. 2013). Después de unirse a su diana en la superficie de la célula
30 hospedadora, Pre-F sufre un cambio conformacional durante el cual los sitios Ø

y V ya no están expuestos. Pre-F pasa a una conformación intermedia transitoria, lo que permite que la proteína F se inserte en la membrana de la célula hospedadora, lo que lleva a la fusión de las membranas vírica y de la célula hospedadora. Un cambio conformacional final da como resultado una forma más estable y alargada de la proteína (posfusión, Post-F). El sitio II y el sitio IV de la proteína F están presentes en las conformaciones Pre-F y Post-F. El sitio I también está presente en las conformaciones Pre-F y Post-F, pero los anticuerpos contra el sitio I se unen más estrechamente a la conformación Post-F que a la Pre-F.

10 En el presente documento se proporcionan ARN (p. ej., ARNm) que codifican polipéptidos F antigénicos del RSV.

 En un aspecto, la divulgación proporciona una vacuna contra el virus respiratorio sincicial (RSV) que comprende un ARN mensajero (ARNm) que comprende un marco abierto de lectura (ORF) que codifica un antígeno proteico F del RSV, en donde el antígeno proteico F del RSV comprende una secuencia de aminoácidos con al menos al menos un 98 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

 En algunas realizaciones, se bloquea un epítipo de la proteína F del RSV que se comparte 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 el ARN (p. ej., ARNm) que codifica el polipéptido F antigénico del RSV. Esto puede aumentar la proporción de anticuerpos que se dirigen a un epítipo específico de una conformación particular de F, tal como la conformación prefusión (p. ej., anticuerpos que se dirigen al sitio Ø). Debido a que F tiene la conformación prefusión en 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 relación de neutralización a unión, como se describe en el presente documento). El bloqueo se puede lograr mediante la genomanipulación de una fracción voluminosa, tal como un N-glucano en las proximidades del epítipo compartido. Por ejemplo, se puede añadir un sitio de N-glucosilación no presente en F de tipo silvestre, por ejemplo, mediante la mutación de un resto adecuado a asparagina. En algunas

realizaciones, el epítopo bloqueado es un epítopo del sitio antigénico I de F del RSV. En algunas realizaciones, se bloquean dos o más epítopos compartidos entre pre-F y post-F. En algunas realizaciones, se bloquean dos o más epítopos del sitio antigénico I de F del RSV. En algunas realizaciones, también se
5 bloquean uno o más, o todos, los epítopos que se superponen topológicamente con el epítopo bloqueado, opcionalmente en donde el epítopo bloqueado es un epítopo del sitio antigénico I de F del RSV.

En algunas realizaciones, el polipéptido F del RSV comprende una sustitución de asparagina en una o más posiciones correspondientes a la
10 posición 328, 348 o 507 de la SEQ ID NO: 9 (es decir, E328N, S348N o R507N). En algunas realizaciones, el polipéptido F del RSV comprende una sustitución de asparagina en dos o más posiciones correspondientes a la posición 328, 348 o 507 de la SEQ ID NO: 9 (es decir, E328N, S348N o R507N). En algunas realizaciones, el polipéptido F del RSV comprende una sustitución de asparagina
15 en las posiciones 328, 348 y 507 de la SEQ ID NO: 9 (es decir, E328N, S348N y R507N).

Como se mostró anteriormente, se ha descubierto que dichas asparaginas pueden funcionar como sitios de glucosilación (véase la publicación internacional n.º WO 2019/195291, incorporada en el presente documento como referencia).
20 Además, sin desear estar ligado a ninguna teoría particular, los glucanos en estos sitios pueden inhibir el desarrollo de anticuerpos contra epítopos cercanos, que incluyen epítopos comunes a la proteína F del RSV antes y después de la fusión, cuando el ARN (p. ej., ARNm) que codifica el polipéptido F antigénico del RSV se administra a un sujeto. En algunas realizaciones, la glucosilación de la
25 asparagina correspondiente a la posición 328, 348 o 507 de la SEQ ID NO: 9 bloquea al menos un epítopo compartido entre F del RSV prefusión y F del RSV posfusión, tal como un epítopo del sitio antigénico 1. La inhibición del desarrollo de anticuerpos contra epítopos comunes a la proteína F del RSV antes y después de la fusión puede ser beneficiosa porque puede dirigir el desarrollo de
30 anticuerpos contra epítopos específicos de la proteína F del RSV prefusión, tal como el epítopo del sitio Ø, que puede tener una actividad neutralizante más eficaz que los anticuerpos contra otros epítopos F del RSV. El epítopo del sitio

Ø implica los restos de aminoácidos 62 a 69 y 196 a 209 de la SEQ ID NO: 9. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el polipéptido F del RSV comprende los restos de aminoácidos 62 a 69 y 196 a 209 de la SEQ ID NO: 9.

Los polipéptidos F del RSV descritos en el presente documento pueden tener eliminaciones o sustituciones de diferente longitud con respecto a F del RSV de tipo silvestre. Por ejemplo, en el polipéptido F del RSV de SEQ ID NO: 9, las posiciones 98 a 144 de la secuencia de tipo silvestre (SEQ ID NO: 9) se reemplazan por GSGNVGL (SEQ ID NO: 20), lo que da como resultado una eliminación neta de 40 aminoácidos, de modo que las posiciones 328, 348 o 507 de la SEQ ID NO: 9 corresponden a las posiciones 288, 308 y 467 de la SEQ ID NO: 1. En la alternativa, en el polipéptido F del RSV de SEQ ID NO: 1, las posiciones 98 a 146 de la secuencia de tipo silvestre (SEQ ID NO: 9) se reemplazan por GSGNVGLGG (SEQ ID NO: 21, posiciones 98 a 106 de la SEQ ID NO: 1), lo que da como resultado una eliminación neta de 40 aminoácidos, de modo que las posiciones 328, 348 o 507 de la SEQ ID NO: 9 corresponden a las posiciones 290, 310 y 469 de la SEQ ID NO: 1.

En general, las posiciones en las construcciones descritas en el presente documento se pueden mapear a la secuencia de tipo silvestre de SEQ ID NO: 9 mediante alineamiento por pares, por ejemplo, utilizando el algoritmo Needleman-Wunsch con parámetros convencionales (matriz EBLOSUM62, penalización por hueco 10, penalización por extensión de hueco 0.5). Véase también la discusión sobre alineación estructural proporcionada en el presente documento como un enfoque alternativo para identificar posiciones correspondientes.

En algunas realizaciones, el polipéptido F del RSV comprende mutaciones que añaden glucanos para bloquear epítomos en el antígeno prefusión que son estructuralmente similares a aquellos en la superficie de F del RSV posfusión. En algunas realizaciones, se añaden glucanos para bloquear específicamente los epítomos que pueden estar presentes en la conformación posfusión de F del RSV. En algunas realizaciones, se añaden glucanos que bloquean los epítomos que pueden estar presentes en la conformación posfusión de F del RSV, pero no

afectan uno o más epítomos presentes en la conformación prefusión de F del RSV, tal como el epítomo del sitio Ø.

En algunas realizaciones, el polipéptido F de RSV comprende una secuencia que tiene al menos un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 99.5 % de identidad con la secuencia de aminoácidos que se expone a continuación:

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTS
VITIELSNIKKNCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTQATNNRARR
ELPRFMNYTLNNAKKTNTLSKKRKRRLGFLGVSAGVAVSKVLHLEG
10 EVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLT SKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIE
TVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTK
EGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKT
15 FSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSE
FDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLS
TFL (SEQ ID NO: 22)

En algunas realizaciones, el polipéptido F de RSV comprende una secuencia que tiene al menos un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 99.5 % de identidad con la secuencia de aminoácidos que se expone a continuación:

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTS
VITIELSNIKENKNCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIAS
GVAVSKVLHLEGEVNVKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTFKVLDLKNYIDKQLL
25 PILNKQSCSISNPETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLS
LINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKNKSNICLTRDRGWYCDNAGNVSFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSRTPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT
KCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGE
30 PIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNELINQSLAFINQSDHELLHNVNAGKSTTNIMIT
TIIIVIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO: 1)

En algunas realizaciones, el polipéptido F del RSV comprende las sustituciones de aminoácidos de DS-CAV1 (como se describe, por ejemplo, en McLellan *et al.*, Science, 342(6158): 592-598, 2013) en donde se realizan modificaciones adicionales que incluyen al menos una, dos o tres de las asparaginas descritas anteriormente. Las mutaciones de CAV1 son S190F y V207L en relación con la SEQ ID NO: 9. Las mutaciones de DS son S155C y S290C en relación con la SEQ ID NO: 9.

En algunas realizaciones, una sustitución de aminoácidos o un par de sustituciones de aminoácidos son sustituciones estabilizadoras entre protómeros. Sustituciones ilustrativas que pueden ser estabilizadoras entre protómeros son V207L; N228F; I217V y E218F; I221L y E222M; o Q224A y Q225L, utilizando la numeración de posición de la SEQ ID NO: 9.

En algunas realizaciones, una sustitución de aminoácidos o un par de sustituciones de aminoácidos son estabilizadores intraprotómeros. Sustituciones ilustrativas que pueden ser estabilizadoras intraprotómeros son V220I; A74L y Q81L, utilizando la numeración de posición de la SEQ ID NO: 9.

En algunas realizaciones, una sustitución de aminoácidos estabiliza la hélice, es decir, se prevé que estabilizará el dominio helicoidal de F del RSV. La estabilización del dominio helicoidal puede contribuir a la estabilidad del epítipo del sitio Ø y de la conformación prefusión de F del RSV en general. Sustituciones ilustrativas que pueden estabilizar la hélice son N216P o I217P, utilizando la numeración de posición de la SEQ ID NO: 9. La posición 217 en la SEQ ID NO: 9 corresponde a la posición 177 en la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, una sustitución de aminoácidos es la protección de hélice. En algunas realizaciones, una sustitución de aminoácidos es la protección de hélice PRO. La protección de la hélice se basa en la observación biofísica de que, si bien una mutación del resto de prolina colocada en una hélice alfa puede alterar la formación de la hélice, una prolina en el extremo N de una región helicoidal puede ayudar a inducir la formación de hélices al estabilizar los ángulos de enlace PHI/PSI. Sustituciones ilustrativas que pueden proteger la hélice son N216P o I217P, utilizando la numeración de posición de la SEQ ID NO: 9.

En algunas realizaciones, una sustitución de aminoácido reemplaza una mutación disulfuro de DS-CAV1. En algunas realizaciones, el disulfuro genomodificado de DS-CAV1 se revierte al tipo silvestre (mutaciones C69S y/o C212S de DS-CAV1 utilizando la numeración de posiciones de la SEQ ID NO: 9). En algunas realizaciones, uno o más restos C de DS-CAV1 se reemplazan por un resto S para eliminar un enlace disulfuro. En algunas realizaciones, la sustitución C69S o C212S utilizando la numeración de posiciones de la SEQ ID NO: 9 elimina un enlace disulfuro. En algunas realizaciones, un polipéptido F del RSV comprende C69S y C212S utilizando la numeración de posiciones de la SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, reemplazar dichas cisteínas y eliminar así un enlace disulfuro bloquea la reducción (es decir, la aceptación de electrones de un agente reductor) del polipéptido F del RSV. En algunas realizaciones, la sustitución I217P utilizando la numeración de posiciones de la SEQ ID NO: 9 está incluida en un antígeno en lugar de una sustitución en C69 y/o C212.

En algunas realizaciones, una sustitución de aminoácidos previene la proteólisis por tripsina o proteasas similares a la tripsina. En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos que previene dicha proteólisis está en la región B de repetición de heptada (HRB, del inglés *heptad repeat B*) de F del RSV.

La aparición de fragmentos coherentes con la proteólisis de un polipéptido F del RSV que comprendía una región HRB de tipo silvestre sugirió que se estaba apuntando a una lisina o arginina en esta región para la proteólisis. Una sustitución de aminoácidos para eliminar un resto K o R puede denominarse inactivación (KO, del inglés *knockout*). En algunas realizaciones, una K o R se sustituye por L o Q. En algunas realizaciones, una K se sustituye por L o Q. En algunas realizaciones, el polipéptido F del RSV comprende K498L y/o K508Q, utilizando la numeración de posición de la SEQ ID NO: 9. Las posiciones correspondientes en la SEQ ID NO: 1 son 458 y 468, respectivamente. En algunas realizaciones, el polipéptido F del RSV comprende tanto K498L como K508Q.

En algunas realizaciones, una sustitución de aminoácidos añade glucanos. En algunas realizaciones, una sustitución de aminoácidos aumenta la glucosilación mediante la adición de glucanos a los polipéptidos F del RSV. Las sustituciones para añadir glucanos también pueden denominarse glucosilación genomanipulada, en comparación con la glucosilación natural (sin glucanos adicionales).

En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos para añadir glucanos es la sustitución con un N. En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos con un N permite la glucosilación ligada a N. En algunas realizaciones, la sustitución con un N va acompañada de una sustitución con una T o S en la posición carboxiterminal del segundo aminoácido con respecto a N, que forma un motivo de glucosilación NxT/S. En algunas realizaciones, el N está expuesto en la superficie.

Cada una de las sustituciones y mutaciones mencionadas anteriormente en el polipéptido F del RSV se describen con más detalle en la publicación internacional n.º WO 2019/195291, que se incorpora en el presente documento como referencia.

En un aspecto, la divulgación proporciona una vacuna contra el RSV, que comprende un ARN mensajero (ARNm) que comprende un marco abierto de lectura (ORF) que codifica un antígeno proteico F del RSV, en donde el antígeno proteico F del RSV comprende una o más de las siguientes sustituciones con respecto a una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9:

- 1) las posiciones de aminoácidos 98 a 146 de la SEQ ID NO: 9 se reemplazan por una secuencia de aminoácidos de GSGNVGLGG (SEQ ID NO: 21);
- 2) las sustituciones de aminoácidos S190F y V207L;
- 3) la sustitución de aminoácidos I217P;
- 4) las sustituciones de aminoácidos E328N, S348N y R507N;
- 5) la sustitución de aminoácidos L373R;
- 6) la sustitución de aminoácidos K498L; y
- 7) la sustitución de aminoácidos K508Q.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una vacuna contra el RSV que comprende un ARNm que comprende un ORF que codifica un antígeno proteico F del RSV, en donde el antígeno proteico F del RSV comprende cada una de las siguientes sustituciones con respecto a una secuencia de aminoácidos expuesta

5 en la SEQ ID NO: 9:

1) las posiciones de aminoácidos 98 a 146 de la SEQ ID NO: 9 se reemplazan por una secuencia de aminoácidos de GSGNVGLGG (SEQ ID NO: 21);

2) las sustituciones de aminoácidos S190F y V207L;

10 3) la sustitución de aminoácidos I217P;

4) las sustituciones de aminoácidos E328N, S348N y R507N;

5) la sustitución de aminoácidos L373R;

6) la sustitución de aminoácidos K498L; y

7) la sustitución de aminoácidos K508Q.

15 En determinadas realizaciones, el antígeno proteico F del RSV comprende un dominio transmembrana y una secuencia de aminoácidos de la cola citoplasmática de IMITTIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO: 23).

20 En algunas realizaciones, el ARNm comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o el 100 % de identidad con una secuencia de ácido nucleico expuesta en
25 una cualquiera de las SEQ ID NO: 24 a 26 siguientes:

AUGGAAUUGCUGAUCCUCAAAGCGAACGCAAUCACCACUAUCCUCACUG
CGGUCACCUUCUGCUUUGCGAGCGGACAGAACAUCACCGAAGAAUUCUA
CCAAUCUACUUGCUCGCCGUGUCCAAGGGUUACCUGUCCGCCUGAG
GACCGGAUGGUACACUUCGUGAUUACCAUUGAGUUGUCGAAUAUCAAG
30 AAGAACAAGUGCAACGGAACCGAUGCUAAGGUCAAGCUGAUCAAGCAGG
AGCUGGACAAGUACAAGAAUGCUGUGACCGAGCUGCAGCUGCUGAUGC
AGUCCACUCAAGCCACCAACAAUCGCGCCCGGCGGGAACUCCCAAGGUU

CAUGAACUACACCUUGAACAACGCCAAGAAAACGAACGUGACCCUGUCC
 AAGAAGCGCAAGCGCAGAUUCCUUGGCUUCCUUCUGGGCGUCGGUAGC
 GCCAUCGCCUCCGGCGUGGCCGUCAGCAAGGUCCUGCACCUCGAGGGA
 GAAGUCAACAAGAUUAAGAGCGCCCUGCUGUCCACCAACAAGGCCGUGG
 5 UGUCGCUAUCAAACGGCGUCAGCGUACUGACCAGCAAAGUGCUGGAUC
 UCAAGAACUACAUUGAUUAGCAACUCCUCCCUAUCGUGAAUAAGCAGAG
 CUGUUCGAUUUCCAACAUCGAGACUGUGAUUGAAUUCAGCAGAAGAAC
 AACCGGCUGCUGGAAAUUACCAGAGAAUUCAGCGUGAAUGCCGGAGUCA
 CUACCCCGUGUCCACCUACAUGCUGACAAACUCCGAGCUGCUGAGCCU
 10 GAUCAACGAUAUGCCGAUUACCAACGACCAGAAGAAGCUGAUGUCGAAC
 AACGUGCAGAUUCGUGCGCCAGCAGUCCUACUCAAUCAUGUCGAUCAUCA
 AGGAAGAGGUCCUGGCCUACGUGGUGCAGCUUCCUCUGUACGGCGUGA
 UUGACACUCCGUGUUGGAAACUGCACACUAGUCCCCUGUGCACUACUAA
 CACCAAGGAGGGCAGCAAUAUCUGCCUGACUCGGACCGAUAGAGGCUG
 15 GUACUGUGAUUACGCCGGGUCCGUGUCCUUCUUCCCGCAAGCCGAGAC
 UUGCAAAGUGCAGAGCAACCGGGUGUUCUGUGACACUAUGAACUCACUG
 ACCUUGCCGAGCGAAGUCAACCUUUGCAACGUGGACAUCUUUAACCCUA
 AAUACGACUGCAAGAUCAUGACCUCCAAGACCGACGUGUCGAGCUCAGU
 GAUUACUUCGCUGGGAGCCAUUGUGUCCUGCUACGGGAAAACCAAGUG
 20 CACGGCCUCAACAAGAACCGGGGUAUCAUUAAGACCUUCUCCAACGGC
 UGCGACUAUGUGUCCAACAAGGGGGUGGACACUGUGUCCGUGGGAAAC
 ACCUUGUAUUACGUGAACAAGCAGGAGGGAAAGUCCCUCUACGUGAAGG
 GCGAACCCAUCAUCAAUUUCUACGACCCGCUCGUGUCCCCUCCGAUGA
 AUUCGACGCAUCCAUCUCACAAGUCAACGAAAAGAUUAACCAGUCCUG
 25 GCUUUCAUUCGCAAGUCCGACGAACUGCUCCAUAACGUCAACGCUGGAA
 AGUCCACCACCAACAUCAUGAUCACCACGAUCAUUAUUGUGAUCAUCGU
 CAUCCUGCUGUCACUGAUAGCAGUGGGACUGCUCCUCUACUGCAAAGC
 GCGGUCGACCCCAGUGACACUCUCGAAGGACCAGCUGUCCGGGAUCAA
 CAACAUCGCGUUUUCGAACUGA (SEQ ID NO: 24)
 30 AUGGAACUCCUGAUCCUGAAGGCCAAUGCUAUCACUACCAUCCUGACUG
 CCGUCACCUUCUGCUUCGCCUCCGGACAAAUAUCACUGAAGAAUUUUA
 CCAAAGCACCUGUAGCGCGGUGUCCAAGGGAUACCUGAGCGCUCUGAG

GACCGGAUGGUACACCAGCGUGAUUACCAUCGAGCUGAGUAACAUCAAG
 AAGAACAAGUGCAACGGGACCGAUGCUAAGGUCAAGUUGAUCAAACAAG
 AGCUCGACAAGUACAAGAACGCCGUGACUGAGCUGCAGCUGCUGAUGCA
 GUCAACUCAGGCCACCAACAACCGGGCCAGACGGGAACUGCCGAGAUUC
 5 AUGAACUACACCCUGAACAACGCCAAAAAGACCAACGUGACCCUGUCCAA
 GAAGAGAAAGCGCCGGUUCUGGGUUUCCUGCUUUGGCGUGGGGAUCAGC
 AAUCGCGUCCGGAGUGGCAGUGUCCAAGGUCUUGCACCUCGAGGGCGA
 AGUGAACAAGAUCAAGUCCGCGCUUCUGUCGACCAACAAGGCCGUCGUU
 UCCCUGUCGAACGGAGUGUCCGUGCUCACGAGCAAAGUGCUCGACCUG
 10 AAGAACUACAUCGACAAACAGCUGCUGCCCAUCGUCAACAAGCAGAGCU
 GCAGCAUCUCAAACAUUGAAACCGUGAUCGAGUUC CAGCAGAAGAACAA
 CCGCCUGCUCGAGAUUACCAGAGAGUUUUC CGUGAACGCCGGCGUGAC
 CACCCCGGUGUCGACCUACAUGCUCACAAAUUCGGAACUUCUCUCCCUG
 AUUAAUGACAUGCCCAUUAACGAUCAGAAAAAGCUGAUGUCGAACAA
 15 UGUGCAGAUUGUGCGCCAGCAGUCCUACUCCAUCAUGUCCAUCAUUAAG
 GAAGAGGUCCUGGCCUACGUGGUGCAGUUGCCGCUGUACGGUGUCAUC
 GAUACCCCCUGCUGGAAGCUCCAUA CUUCGCCCCUGUGUACUACCAACA
 CCAAGGAAGGCUCCAACAUCUGCCUGACCCGGACGGAUCGCGGCUGGU
 ACUGUGACAAUGCCGGAUCCGUGUCGUUCU UCCCGCAAGCGGAGACUU
 20 GCAAAGUGCAGUCCAACCGGGUGUUCUGUGACACUAUGAACUCCCUGAC
 UCUGCCGUCCGAAGUCAACCUCUGCAACGUGGACAUUUUCAAUCCAAAA
 UACGACUGCAAGAUAAUGACCUCCAAGACUGACGUGUCAUCGUCCGUGA
 UCACAUCUCUGGGAGCCAUUGUCUCCUGCUACGGAAAGACUAAGUGCAC
 CGCGUCGAACAAGAACAGGGGCAUUAUCAAGACCUUCAGCAACGGUUGC
 25 GACUAUGUGUCCAACAAGGGCGUGGAUACCGUGUCCGUGGGCAACACC
 UUGUACUACGUGAACAAGCAGGAGGGGAAGUCCCUUUUAUGUGAAGGGG
 GAGCCAAUCAUUAACUUUUACGACCCCCUGGUGUUCCCUAGCGACGAGU
 UCGACGCCUCAAUUCUCUCAAGUCAACGAAAAGAUCAACCAGAGCCUCGC
 CUUCAUCCGCAAGUCCGAUGAACUGCUGUCAGCCAUUGGGGGGUUACAU
 30 CCCUGAGGCCCCUCGGGACGGACAGGCAUACGUCCGCAAGGACGGCGA
 AUGGGUGCUGCUUAGCACCUUCCUCUAA (SEQ ID NO: 25)

AUGGAACUGCUGAUCCUCAAGCCAAACGCAAUCACCACCAUUCUCACCG
 CUGUGACCUUCUGCUUCGCAUCGGGGCAGAACAUCACUGAAGAGUUUU
 ACCAGAGCACUUGCAGCGCGGUGUCAAGGGUUACCUUUCGCACUGC
 GGACCGGAUGGUACACUUCCGUGAUCACCAUUGAGCUCAGCAACAUCAA
 5 GGAAAACAAGUGCAAUGGCACCGACGCCAAGGUCAAGCUGAUCAAACAA
 GAACUGGACAAGUACAAGAACGCCGUGACAGAAUUGCAGCUCCUGAUGG
 GAUCCGGAAACGUCGGUCUGGGCGGAGCCAUCGCGAGUGGAGUGGCUG
 UGUCCAAGGUCUUGCACCUCGAGGGAGAAGUGAACAAGAUCAAGUCCGC
 GCUGCUGUCAACGAACAAGGCCGUGGUGUCCUGUCUAACGGCGUCAG
 10 CGUGCUGACGUUCAAGGUCCUGGACCUGAAGAAUUACAUUGACAAGCAG
 CUGCUGCCCAUCCUCAACAAGCAAUCCUGCUCCAUCUCCAACCCCGAAA
 CCGUGAUCGAGUUCAGCAGAAGAACAACCGCCUGCUGGAAAUUACUCG
 CGAGUUCUCUGUGAAUGCCGGCGUGACCACCCUGUGUCCACCUACAU
 GCUGACCAACUCCGAGCUUCUCUCCCUUAUCAUUGACAUGCCUAUCACG
 15 AACGACCAGAAGAAGCUGAUGUCGAACAACGUGCAGAUUGUGCGGCAGC
 AGUCAUACAGCAUCAUGUCGAUCAUCAAGGAAGAAGUGCUGGCGUACGU
 GGUGCAACUCCCGCUGUACGGCGUCAUCGAUACCCCGUGCUGGAAGCU
 GCACACCUCGCCUUUGUGUACCACCAACACCAAGAACGGAUCCAACAUC
 UGCUUAACCCGGACUGAUCGGGGUUGGUACUGCGACAACGCCGGGAAU
 20 GUUUCGUUCUUCCCAACAAGCCGAGACUUGUAAAGUGCAGUCAACAGAG
 UGUUCUGUGACACCAUGAACUCGAGAACCCUGCCCAGCGAAGUGAACCU
 GUGUAACGUCGACAUCUUUAACCCAAAAUACGAUUGCAAGAUUAUGACC
 AGCAAAACCGACGUGUCCUCCUCCGUGAUACAAGCCUGGGGGCGAUU
 GUGUCAUGCUACGGAAAGACUAAGUGCACCGCCUCGAACAAGAACCGCG
 25 GCAUCAUUAAGACUUUCUCGAAUGGUUGCGACUAUGUGUCCAACAAGGG
 CGUGGAUACUGUGUCAGUCGGGAAUACUCUUUACUACGUGAACAAGCAG
 GAGGGGAAAAGCCUCUACGUGAAGGGAGAGCCUAUUAUCAACUUUUACG
 AUCCGCUGGUGUUCCCGUCCGACGAAUUCGACGCCAGCAUCAGCCAAG
 UCAACGAGCUGAUUAACCAGUCCCUCGCCUUCAUCAACCAAUCCGACGA
 30 GCUCCUGCAUAACGUGAACGCCGGAAGUCCACCACCAACAUCAUGAUC
 ACUACUAUUAUCAUCGUGAUAUCGUCAUCCUGCUGAGCCUGAUUGCUG
 UGGGCCUGUUGCUGUAUUGCAAAGCCAGGUCCACCCCGGUCACCCUGU

CGAAGGAUCAGCUGUCCGGAAUCAACAACAUUGCCUUCUCCAACUAA
(SEQ ID NO: 26)

En algunas realizaciones, el ARNm comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o el 100 % de identidad con una secuencia de ácido nucleico expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 27 a 29 siguientes:

GGACAGAU CGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAA
10 GACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAA
CGCGGAU UCCCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGGA
AUUGCUGAUCCUCAAGCGAACGCAAUCACCACUAUCCUCACUGCGGUC
ACCUUCUGCUUUGCGAGCGGACAGAACAUCAACCGAAGAAUUCUACCAAU
CUACUUGCUCCGCCGUGUCCAAGGGUUACCUGUCCGCCUGAGGACCG
15 GAUGGUACACUCCGUGAUUACCAUUGAGUUGUCGAAUAUCAAGAAGAA
CAAGUGCAACGGAACCGAUGCUAAGGUCAAGCUGAUCAAGCAGGAGCUG
GACAAGUACAAGAAUGCUGUGACCGAGCUGCAGCUGCUGAUGCAGUCCA
CUCAAGCCACCAACAAUUCGCGCCCGGCGGGAACUCCCAAGGUUCAUGAA
CUACACCUUGAACAACGCCAAGAAAACGAACGUGACCCUGUCCAAGAAG
20 CGCAAGCGCAGAUUCCUUGGCUUCCUUCUGGGCGUCGGUAGCGCCAUC
GCCUCCGGCGUGGCCGUCAGCAAGGUCCUGCACCUCGAGGGAGAAGUC
AACAAAGAUUAAGAGCGCCCUGCUGUCCACCAACAAGGCCGUGGUGUCGC
UAUCAACGGCGUCAGCGUACUGACCAGCAAAGUGCUGGAUCUCAAGAA
CUACAUUGAUUAAGCAACUCCUCCCUAUCGUGAAUAAGCAGAGCUGUUCG
25 AUUUCCAACAUCGAGACUGUGAUUGAAUUCAGCAGAAGAACAACCGGC
UGCUGGAAAUUACCAGAGAAUUCAGCGUGAAUGCCGGAGUCACUACCCC
CGUGUCCACCUACAUGCUGACAAACUCCGAGCUGCUGAGCCUGAUCAAC
GAUAUGCCGAUUACCAACGACCAGAAGAAGCUGAUGUCGAACAACGUGC
AGAUCGUGCGCCAGCAGUCCUACUCAAUCAUGUCGAUCAUCAAGGAAGA
30 GGUCCUGGCCUACGUGGUGCAGCUUCCUCUGUACGGCGUGAUUGACAC
UCCGUGUUGGAAACUGCACACUAGUCCCCUGUGCACUACUAAACACCAAG
GAGGGCAGCAAUAUCUGCCUGACUCGGACCGAUAGAGGCUGGUACUGU

GAUAACGCCGGGUCCGUGUCCUUCUUCCCGCAAGCCGAGACUUGCAAA
 GUGCAGAGCAACCGGGUGUUCUGUGACACUAUGAACUCACUGACCUUG
 CCGAGCGAAGUCAACCUUUGCAACGUGGACAUCUUUAACCCUAAAUACG
 ACUGCAAGAUAUGACCUCCAAGACCGACGUGUCGAGCUCAGUGAUUAC
 5 UUCGCUGGGAGCCAUUGUGUCCUGCUACGGGAAAACCAAGUGCACGGC
 CUCAAACAAGAACCGGGGUAUCAUUAAGACCUUCUCCAACGGCUGCGAC
 UAUGUGUCCAACAAGGGGGUGGACACUGUGUCCGUGGGAAACACCUUG
 UAUUACGUGAACAAGCAGGAGGGAAAGUCCCUCUACGUGAAGGGCGAAC
 CCAUCAUCAAUUUCUACGACCCGCUCGUGUUCCCCUCCGAUGAAUUCGA
 10 CGCAUCCAUCUCACAAGUCAACGAAAAGAUUAACCAGUCCCUGGCUUUC
 AUUCGCAAGUCCGACGAACUGCUCCAUAACGUCAACGCUGGAAAGUCCA
 CCACCAACAUCAUGAUCACCACGAUCAUUAUUGUGAUAUCGUCAUCCU
 GCUGUCACUGAUAGCAGUGGGACUGCUCCUCUACUGCAAAGCGCGGUC
 GACCCCAGUGACACUCUCGAAGGACCAGCUGUCCGGGAUCAACAACAUC
 15 GCGUUUUCGAACUGACGGGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCC
 UCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCU
 AAUAAAAUUAAGUUGCAUC (SEQ ID NO: 27)
 GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAA
 GACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAA
 20 CGCGGAUUCCCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGGA
 ACUCCUGAUCCUGAAGGCCAAUGCUAUCACUACCAUCCUGACUGCCGUC
 ACCUUCUGCUUCGCCUCCGGACAAAUAUCACUGAAGAAUUUUACCAA
 GCACCUGUAGCGCGGUGUCCAAGGGAUACCUGAGCGCUCUGAGGACCG
 GAUGGUACACCAGCGUGAUUACCAUCGAGCUGAGUAACAUCAAGAAGAA
 25 CAAGUGCAACGGGACCGAUGCUAAGGUCAAGUUGAUCAAACAAGAGCUC
 GACAAGUACAAGAACGCCGUGACUGAGCUGCAGCUGCUGAUGCAGUCAA
 CUCAGGCCACCAACAACCGGGCCAGACGGGAACUGCCGAGAUUCAUGAA
 CUACACCCUGAACAACGCCAAAAAGACCAACGUGACCCUGUCCAAGAAG
 AGAAAGCGCCGGUUCUCCUGGGUUUCCUGCUUGGCGUGGGAUCAAGCAAUC
 30 GCGUCCGGAGUGGCAGUGUCCAAGGUCUUGCACCUCGAGGGCGAAGUG
 AACAAAGAUCAAGUCCGCGCUUCUGUCGACCAACAAGGCCGUCGUUCCCC
 UGUCGAACGGAGUGUCCGUGCUCACGAGCAAAGUGCUCGACCUGAAGA

ACUACAUCGACAAACAGCUGCUGCCCAUCGUCAACAAGCAGAGCUGCAG
 CAUCUCAAACAUUGAAACCGUGAUCGAGUUCAGCAGAAGAACAACCGC
 CUGCUCGAGAUUACCAGAGAGUUUUCGUGAACGCCGGCGUGACCACC
 CCGGUGUCGACCUACAUGCUCACAAAUUCGGAACUUCUCUCCCUGAUUA
 5 AUGACAUGCCCAUUAACGAUCAGAAAAAGCUGAUGUCGAACAAUGU
 GCAGAUUGUGCGCCAGCAGUCCUACUCCAUCAUGUCCAUCAUUAAGGAA
 GAGGUCCUGGCCUACGUGGUGCAGUUGCCGCUGUACGGUGUCAUCGAU
 ACCCCCUGCUGGAAGCUCCAUAUUCGCCCCUGUGUACUACCAACACCA
 AGGAAGGCUCCAACAUCUGCCUGACCCGGACGGAUCGCGGCUGGUACU
 10 GUGACAAUGCCGGAUCCGUGUCGUUCUUCCCGCAAGCGGAGACUUGCA
 AAGUGCAGUCCAACCGGGUGUUCUGUGACACUAUGAACUCCCUGACUCU
 GCCGUCCGAAGUCAACCUCUGCAACGUGGACAUUUUCAAUCCAAAAUAC
 GACUGCAAGAUAAUGACCUCCAAGACUGACGUGUCAUCGUCCGUGAUCA
 CAUCUCUGGGAGCCAUUGUCUCCUGCUACGGAAAGACUAAGUGCACCG
 15 CGUCGAACAAGAACAGGGGCAUUAUCAAGACCUUCAGCAACGGUUGCGA
 CUAUGUGUCCAACAAGGGCGUGGAUACCGUGUCCGUGGGCAACACCUU
 GUACUACGUGAACAAGCAGGAGGGGAAGUCCCUUUUAUGUGAAGGGGGA
 GCCAAUCAUUAACUUUUACGACCCCCUGGUGUUCCCUAGCGACGAGUUC
 GACGCCUCAAUUCUCUCAAGUCAACGAAAAGAUCAACCAGAGCCUCGCCU
 20 UCAUCCGCAAGUCCGAUGAACUGCUGUCAGCCAUUGGGGGGUUACAUC
 CUGAGGCCCCUCGGGACGGACAGGCAUACGUCCGCAAGGACGGCGAAU
 GGGUGCUGCUUAGCACCUUCCUCUAACGGGUGGCAUCCCUUGUGACCCC
 UCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACC
 AGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUC (SEQ ID NO: 28)
 25 GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAA
 GACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAA
 CGCGGAUUCCCCGUGCCAAGAGUGACUACCGUCCUUGACACGAUGGA
 ACUGCUGAUCCUCAAGCCAACGCAAUCACCACCAUUCUCACCGCUGUG
 ACCUUCUGCUUCGCAUCGGGGCAGAACAUCACUGAAGAGUUUUACCAGA
 30 GCACUUGCAGCGCGGUGUCAAGGGGUUACCUUCCGCACUGCGGACCG
 GAUGGUACACUUCGUGAUCACCAUUGAGCUCAGCAACAUCAAGGAAAA
 CAAGUGCAAUGGCACCGACGCCAAGGUCAAGCUGAUCAAACAAGAACUG

GACAAGUACAAGAACGCCGUGACAGAAUUGCAGCUCCUGAUGGGAUCCG
 GAAACGUCGGUCUGGGCGGAGCCAUCGCGAGUGGAGUGGCUGUGUCCA
 AGGUCUUGCACCUCGAGGGAGAAGUGAACAAGAUCAAGUCCGCGCUGC
 UGUCAACGAACAAGGCCGUGGUGUCCCUGUCUAAACGGCGUCAGCGUGC
 5 UGACGUUCAAGGUCCUGGACCUGAAGAAUUAUUGACAAGCAGCUGCU
 GCCCAUCCUCAACAAGCAAUCCUGCUCCAUCUCCAACCCCGAAACCGUG
 AUCGAGUUCCAGCAGAAGAACAACCGCCUGCUGGAAAUUACUCGCGAGU
 UCUCUGUGAAUGCCGGCGUGACCACCCUGUGUCCACCUACAUGCUGA
 CCAACUCCGAGCUUCUCUCCCUIUAUCAUUGACAUGCCUAUCACGAACGA
 10 CCAGAAGAAGCUGAUGUCGAACAACGUGCAGAUUGUGCGGCAGCAGUCA
 UACAGCAUCAUGUCGAUCAUCAAGGAAGAAGUGCUGGCGUACGUGGUG
 CAACUCCCGCUGUACGGCGUCAUCGAUACCCCGUGCUGGAAGCUGCAC
 ACCUCGCCUUUGUGUACCACCAACACCAAGAACGGAUCCAACAUCUGCU
 UAACCCGGACUGAUCGGGGUUGGUACUGCGACAACGCCGGGAUGUUU
 15 CGUUCUUCCCACAAGCCGAGACUUGUAAAGUGCAGUCAACAGAGUGUU
 CUGUGACACCAUGAACUCGAGAACCCUGCCCAGCGAAGUGAACCUGUGU
 AACGUCGACAUCUUUAACCCAAAAUACGAUUGCAAGAUUAUGACCAGCAA
 AACCGACGUGUCCUCCUCCGUGAUACAAGCCUGGGGGCGAUUGUGUC
 AUGCUACGGAAAGACUAAGUGCACCGCCUCGAACAAGAACCGCGGCAUC
 20 AUUAAGACUUUCUGAAUGGUUGCGACUAUGUGUCCAACAAGGGGCGUG
 GAUACUGUGUCAGUCGGGAUACUCUUUACUACGUGAACAAGCAGGAGG
 GGAAAAGCCUCUACGUGAAGGGAGAGCCUAUUAUCAACUUUUACGAUCC
 GCUGGUGUUCCCGUCCGACGAUUCGACGCCAGCAUCAGCCAAGUCA
 CGAGCUGAUUAACCAGUCCCUCCGCUUCAUCAACCAAUCCGACGAGCUC
 25 CUGCAUAACGUGAACGCCGGAAGUCCACCACCAACAUCAUGAUCACUA
 CUAUUAUCAUCGUGAUCAUCGUAUCCUGCUGAGCCUGAUUGCUGUGG
 GCCUGUUGCUGUAUUGCAAAGCCAGGUCCACCCCGGUCACCCUGUCGA
 AGGAUCAGCUGUCCGGAAUCAACAACAUUGCCUUCUCCAACUAACGGGU
 GGCAUCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUG
 30 CCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUC
 (SEQ ID NO: 29)

En algunas realizaciones, el ORF (por ejemplo, el ORF de hRSV, hMPV o hPIV3) está optimizado con codones. Como se utiliza en el presente documento, "codón optimizado" u "optimización con codones" se refiere a la introducción de determinados codones (a cambio de los respectivos codones de tipo silvestre que codifican el mismo aminoácido), que pueden ser más favorables con respecto a la estabilidad del ARN y/o con respecto al uso de codones en un sujeto.

En determinadas realizaciones, el antígeno proteico F del hRSV está codificado por un ORF de ARNm con codones optimizados establecido como:

10 AUGGAACUGCUGAUCCUCAAGCCAACGCAAUCACCACCAUUCUCACCG
CUGUGACCUUCUGCUUCGCAUCGGGGCAGAACAUACUGAAGAGUUUU
ACCAGAGCACUUGCAGCGCGGUGUCAAGGGUUAACCUUCCGCACUGC
GGACCGGAUGGUACACUUCGUGAUCACCAUUGAGCUCAGCAACAUCAA
GGAAAACAAGUGCAAUGGCACCGACGCCAAGGUCAAGCUGAUCAAACAA
15 GAACUGGACAAGUACAAGAACGCCGUGACAGAAUUGCAGCUCCUGAUGG
GAUCCGGAAACGUCGGUCUGGGCGGAGCCAUCGCGAGUGGAGUGGCUG
UGUCCAAGGUCUUGCACCUCGAGGGAGAAGUGAACAAAGAUCAAGUCCGC
GCUGCUGUCAACGAACAAGGCCGUGGUGUCCCUGUCUAACGGCGUCAG
CGUGCUGACGUUCAAGGUCCUGGACCUGAAGAAUUAUUGACAAGCAG
20 CUGCUGCCCAUCCUCAACAAGCAAUCCUGCUCCAUCUCCAACCCCGAAA
CCGUGAUCGAGUUCAGCAGAAGAACAACCGCCUGCUGGAAAUUACUCG
CGAGUUCUCUGUGAAUGCCGGCGUGACCACCCUGUGUCCACCUACA
GCUGACCAACUCCGAGCUUCUCUCCCUUAUCAUGACAUGCCUAUCACG
AACGACCAGAAGAAGCUGAUGUCGAACAACGUGCAGAUUGUGCGGCAGC
25 AGUCAUACAGCAUCAUGUCGAUCAUCAAGGAAGAAGUGCUGGCGUACGU
GGUGCAACUCCCGCUGUACGGCGUCAUCGAUACCCCGUGCUGGAAGCU
GCACACCUCGCCUUUGUGUACCACCAACACCAAGAACGGAUCCAACAUC
UGC UUAACCCGGACUGAUCGGGGUUGGUACUGCGACAACGCCGGGGAU
GUUUCGUUCUUCCACAAGCCGAGACUUGUAAAGUGCAGUCAAACAGAG
30 UGUUCUGUGACACCAUGAACUCGAGAACCCUGCCCAGCGAAGUGAACCU
GUGUAACGUCGACAUCUUAACCCAAAAUACGAUUGCAAGAUUAUGACC
AGCAAAACCGACGUGUCCUCCUCCGUGAUACAAGCCUGGGGGCGAUU

GUGUCAUGCUACGGAAAGACUAAGUGCACCGCCUCGAACAAGAACCGCG
 GCAUCAUUAAGACUUUCUCGAAUGGUUGCGACUAUGUGUCCAACAAGGG
 CGUGGAUACUGUGUCAGUCGGGAAUACUCUUUACUACGUGAACAAGCAG
 GAGGGGAAAAGCCUCUACGUGAAGGGAGAGCCUAUUAUCAACUUUUACG
 5 AUCCGCUGGUGUUCCTCGUCCGACGAAUUCGACGCCAGCAUCAGCCAAG
 UCAACGAGCUGAUUAACCAGUCCCUUGCCUUAUCAACCAAUCCGACGA
 GCUCCUGCAUAACGUGAACGCCGGAAGUCCACCACCAACAUCAUGAUC
 ACUACUAUUAUCAUCGUGAUCAUCGUCAUCCUGCUGAGCCUGAUUGCUG
 UGGGCCUGUUGCUGUAUUGCAAAGCCAGGUCCACCCCGGUCACCCUGU
 10 CGAAGGAUCAGCUGUCCGGAAUCAACAACAUAUGCCUUCUCCAACUAA
 (SEQ ID NO: 4)

IV. Proteína F del hMPV

El hMPV es un virus de ARN monocatenario de sentido negativo que pertenece a la subfamilia pneumovirus dentro de la familia Paramixovirus. El hMPV infecta las células epiteliales de las vías respiratorias en la nariz y los pulmones y es la segunda causa más común, después del virus respiratorio sincicial (RSV), de infección de las vías respiratorias inferiores en niños pequeños. El hMPV es un virus con envoltura con una glucoproteína (proteína G), una pequeña proteína hidrófoba (proteína SH) y una proteína de fusión (proteína F) en la superficie del virión.

Como es un virus envuelto, la entrada del hMPV en las células hospedadoras requiere la fusión de las membranas viral y celular. La entrada de paramixovirus generalmente requiere dos glucoproteínas víricas, las proteínas de fusión (F) y de unión (G, H o HN), y la fusión de membranas promovida por todas las glucoproteínas 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 la membrana celular y vírica, las glucoproteínas de paramixovirus también promueven la fusión célula-célula. Las células gigantes multinucleadas, denominadas sincitios, se pueden encontrar en tejidos que han sido infectados por una variedad de paramixovirus. Las células cultivadas infectadas con hMPV forman sincitios, pero el examen de las células epiteliales primarias de las vías

respiratorias humanas infectadas con hMPV sugiere que la formación de sincicios por parte de este virus puede no ser un suceso común *in vivo*.

F de hMPV es una glucoproteína de fusión de clase I, sintetizada como un precursor inactivo (F0) que debe escindirse para volverse competente en cuanto a la fusión. La escisión proteolítica genera dos subunidades unidas por disulfuro (F2 N-terminal a F1) que se ensamblan en un homotrímero. La escisión se produce en un sitio de escisión monobásico inmediatamente cadena arriba del péptido de fusión hidrófobo. La escisión se puede lograr en cultivo de tejidos mediante la adición de tripsina exógena al medio o mediante la adición de un plásmido de expresión de furina. Sin embargo, se cree que otras serinproteasas *in vivo*, tales como TMPRSS2, probablemente sean más importantes para la escisión. El trímero de F se incorpora a la partícula vírica en una conformación metaestable, "prefusión" o "pre-F". Para iniciar la fusión de la membrana, la F de hMPV se activa y experimenta una serie de cambios conformacionales graduales en la proteína F que impulsan la fusión de la membrana y dan como resultado que la F de hMPV adopte una conformación "posfusión" o "F-pos" sumamente estable.

En determinadas realizaciones ilustrativas, la escisión proteolítica de F0 se logra mediante cotransfección de un plásmido que codifica un polipéptido F del hMPV y un plásmido que codifica furina en una proporción 4:1 de plásmido de hMPV: plásmido de furina.

En el presente documento se proporcionan polipéptidos antigénicos de hMPV que comprenden un polipéptido F de hMPV. El polipéptido F del hMPV puede comprender la secuencia completa de F del hMPV o una parte de F del hMPV. En determinadas realizaciones, la parte es el ectodominio.

En algunas realizaciones, el polipéptido F del hMPV comprende una secuencia que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 99.5 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 31, 33 y 35.

En algunas realizaciones, el polipéptido F del hMPV comprende un polipéptido F del hMPV modificado que tiene al menos un 80 % de identidad con

los polipéptidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 31, 33 y 35, en donde el polipéptido F del hMPV es antigénico.

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

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

MSWKVVIIFSLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGD
VENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAI
ALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNALKTNEAVSTLGNGVRVLATAVR
ELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAI
10 SLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFILIGVYGSSVIYM
VQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPN
EKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVAL
SPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSK
VEGEQHVIGRPVSSSFDPKFPEDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSS
15 AEKGNT **GFIIVILIAVLGSSMILVSIFIIKKTKKPTGAPPELSGVTNNGFIPHN**

(SEQ ID NO: 10). (Registro AAN52910; Versión AAN52910.1; registro de la fuente de base de datos AY145296.1.) El dominio transmembrana está en negrita y subrayado, y la cola citoplasmática está en negrita.

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

20 ATGTCTTGAAAGTGGTGATCATTTTTTTCATTGCTAATAACACCTCAACACG
GTCTTAAAGAGAGCTACCTAGAAGAATCATGTAGCACTATAACTGAGGGAT
ATCTTAGTGTTCTGAGGACAGGTTGGTATACCAACGTTTTTACATTAGAGG
TGGGTGATGTAGAAAACCTTACATGTTCTGATGGACCTAGCCTAATAAAAA
CAGAATTAGATCTGACCAAAGTGCACTAAGAGAGCTCAAAACAGTCTCTG
25 CTGACCAATTGGCAAGAGAGGAACAAATTGAGAATCCCAGACAATCTAGGT
TTGTTCTAGGAGCAATAGCACTCGGTGTTGCAACAGCAGCTGCAGTCACA
GCAGGTGTTGCAATTGCCAAAACCATCCGGCTTGAGAGTGAAAGTCACAGC
AATTAAGAATGCCCTCAAAACGACCAATGAAGCAGTATCTACATTGGGGAA
TGGAGTTCGAGTGTTGGCAACTGCAGTGAGAGAGCTGAAAGACTTTGTGA
30 GCAAGAATTTAACTCGTGCAATCAACAAAAACAAGTGCGACATTGATGACC
TAAAAATGGCCGTTAGCTTCAGTCAATTCAACAGAAGGTTTCTAAATGTTGT
GCGGCAATTTTCAGACAATGCTGGAATAACACCAGCAATATCTTTGGACTT

AATGACAGATGCTGAACTAGCCAGGGCCGTTTCTAACATGCCGACATCTG
 CAGGACAAATAAAATTGATGTTGGAGAACCGTGCGATGGTGCGAAGAAAG
 GGGTTCGGAATCCTGATAGGGGTCTACGGGAGCTCCGTAATTTACATGGT
 GCAGCTGCCAATCTTTGGCGTTATAGACACGCCTTGCTGGATAGTAAAAGC
 5 AGCCCCTTCTTGTTCCGAAAAAAGGGAACTATGCTTGCCTCTTAAGAGA
 AGACCAAGGGTGGTATTGTCAGAATGCAGGGTCAACTGTTTACTACCCAAA
 TGAGAAAGACTGTGAAACAAGAGGAGACCATGTCTTTTGCGACACAGCAG
 CGGGAATTAATGTTGCTGAGCAATCAAAGGAGTGCAACATCAACATATCCA
 CTACAAATTACCCATGCAAAGTCAGCACAGGAAGACATCCTATCAGTATGG
 10 TTGCACTGTCTCCTCTTGGGGCTCTGGTTGCTTGCTACAAAGGAGTAAGCT
 GTTCCATTGGCAGCAACAGAGTAGGGATCATCAAGCAGCTGAACAAGGGT
 TGCTCCTATATAACCAACCAAGATGCAGACACAGTGACAATAGACAACACT
 GTATATCAGCTAAGCAAAGTTGAGGGTGAACAGCATGTTATAAAAGGCAGA
 CCAGTGTCAAGCAGCTTTGATCCAATCAAGTTTCCTGAAGATCAATTCAAT
 15 GTTGCACTTGACCAAGTTTTTTGAGAACATTGAAAACAGCCAGGCCTTG GTA
 GATCAATCAAACAGAATCCTAAGCAGTGCGAGAGAAAGGGAATACTGGCTTC
 ATCATTGTAATAATTCTAATTGCTGTCCTTGGCTCTAGCATGATCCTAGTGA
 GCATCTTCATTATAATCAAGAAAACAAAGAAACCAACGGGAGCACCTCCAG
 AGCTGAGTGGTGTCAACAAACATGGCTTCATACCACATAATTAG (SEQ ID
 20 NO: 30).

En algunas realizaciones, se bloquea un epítipo de la proteína F de hMPV
 que se comparte entre pre-F y pos-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 F antigénico de hMPV o
 25 cuando se administra a un sujeto un polipéptido F antigénico de hMPV. Esto
 puede aumentar la proporción de anticuerpos que se dirigen a un epítipo
 específico de una conformación particular de F, como la conformación prefusión
 (p. ej., anticuerpos que se dirigen al sitio Ø y/o sitio V). Debido a que F tiene la
 conformación prefusión en virus que aún no han entrado en las células, una
 30 mayor proporción de anticuerpos que se dirigen a pre-F puede proporcionar un
 mayor grado de neutralización (p. ej., expresado como una relación de
 neutralización a unión, como se describe en el presente documento).

Los polipéptidos F del hMPV descritos en el presente documento pueden tener eliminaciones o sustituciones con respecto a la proteína F del hMPV de tipo silvestre (p. ej., SEQ ID NO: 10).

Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un polipéptido de hMPV: (a) carece de un dominio transmembrana y carece de una cola citoplasmática, y comprende un sitio de escisión por proteasa 3C de rinovirus humano (3C-HRV); (b) comprende una mutación del sitio de escisión de F₀ que comprende las sustituciones de aminoácidos Q100R y S101R con respecto a la SEQ ID NO: 10, que reemplaza la glutamina en la posición aminoacídica 100 con arginina, y que reemplaza la serina en la posición aminoacídica 101 con arginina; (c) comprende un péptido señal heterólogo; (d) comprende al menos una secuencia marcadora que es opcionalmente un marcador de polihistidina (p. ej., un marcador 6x His, un marcador 8x His, etc.) y/o un marcador de estreptavidina II; y/o (e) comprende un dominio *foldon*.

En determinadas realizaciones, un polipéptido del hMPV carece de un dominio transmembrana y carece de una cola citoplasmática, y comprende: una mutación del sitio de escisión de F₀ que comprende las sustituciones de aminoácidos Q100R y S101R con respecto a la SEQ ID NO: 10; que reemplaza la glutamina en la posición aminoacídica 100 con arginina y que reemplaza la serina en la posición aminoacídica 101 con arginina; un sitio de escisión por proteasa 3C de rinovirus humano (3C-HRV); un péptido señal heterólogo; un marcador de polihistidina (p. ej., un marcador 6x His, un marcador 8x His, etc.) y/o un marcador de estreptavidina II; y un dominio *foldon*.

En determinadas realizaciones, un polipéptido del hMPV incluye una sustitución de valina, alanina, glicina, isoleucina, leucina o prolina en la posición 185 de la SEQ ID NO: 10.

En determinadas realizaciones, un polipéptido del hMPV incluye una sustitución de fenilalanina, triptófano, tirosina, valina, alanina, isoleucina o leucina en la posición 160 de la SEQ ID NO: 10, y/o una sustitución de valina, alanina, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina o prolina en la posición 46 de la SEQ ID NO: 10.

En determinadas realizaciones, un polipéptido del hMPV incluye una sustitución en la posición 160 de la SEQ ID NO: 10 y una sustitución en la posición 46 de la SEQ ID NO: 10 en donde las sustituciones son "sustituciones estabilizantes" que estabilizan la estructura terciaria y/o cuaternaria de un polipéptido del hMPV. Las sustituciones estabilizadoras incluyen, entre otras, sustitución de: aminoácidos hidrófobos (p. ej., glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina, triptófano, prolina y metionina); aminoácidos hidrófilos (p. ej., cisteína, serina, treonina, asparagina 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 determinadas realizaciones, un polipéptido de hMPV es de una cepa A del hMPV (por ejemplo, un subtipo A1 o un subtipo A2) o de una cepa B del hMPV (por ejemplo, un subtipo B1 o un subtipo B2).

En determinadas realizaciones, se proporciona una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia polipeptídica de F0 "armazón", expuesta como:

MSWKVVIIFSLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGD
VENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRrRFVLGAIAL
GVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNALKTNEAVSTLGNGVRVLATAVREL
KDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISL
DLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQ
LPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEK
DCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVALSPL
GALVACYKGVSCSIGSNRVGIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEG
EQHVIKGRPVSSSFDPKFPEDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEK
GNTggggsgyipeaprdgqayvrkdgewvllstflgrslevlfqgpgghhhhhhsawshpqfek (SEQ
ID NO: 31). (Los aminoácidos en minúscula indican un enlazador, un motivo
foldon, un enlazador, un sitio de escisión de 3C-HRV, un enlazador, un marcador
8X-His y una región marcadora de estreptavidina II).

En determinadas realizaciones, se proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia polipeptídica F0, expuesta como:

ATGAGTTGGAAGGTGGTGATTATCTTCTCCCTGCTGATTACACCACAACAT
GGACTGAAAGAGTCCTACTTGGAGGAGTCCTGTAGCACCATCACAGAGGG
5 CTACCTGTCTGTGCTGAGGACAGGCTGGTACACCAATGTGTTACCTTGG
AGGTGGGAGATGTGGAGAACCTGACTTGTTCTGATGGACCATCCCTGATT
AAGACAGAACTGGACCTGACCAAGTCTGCCCTGAGGGAACTGAAAACAGT
GTCTGCTGACCAACTTGCCAGGGAGGAACAGATTGAGAACCCAAGGAGGA
GGAGGTTTGTGCTGGGAGCCATTGCCCTGGGAGTGGCTACAGCAGCAGC
10 AGTGACAGCAGGAGTGGCTATTGCCAAGACCATCAGATTGGAGTCTGAGG
TGACAGCCATCAAGAATGCCCTGAAAACCAACATGAGGCTGTGAGCACC
CTGGGCAATGGAGTGAGGGTGCTGGCTACAGCAGTGAGGGAACTGAAAG
ACTTTGTGAGCAAGAACCTGACCAGGGCTATCAACAAGAACAAGTGTGAC
ATCGATGACCTGAAAATGGCTGTGTCCTTCAGCCAGTTCAACAGGAGGTTT
15 CTGAATGTGGTGAGACAGTTCTCTGACAATGCTGGCATCACACCTGCCATC
TCCCTGGACCTGATGACAGATGCTGAACTGGCAAGGGCTGTGAGCAATAT
GCCAACCTCTGCTGGACAAATCAAATGATGTTGGAGAACAGGGCTATGG
TGAGGAGGAAGGGCTTTGGCATCCTGATTGGAGTCTATGGCTCCTCTGTG
ATTTATATGGTCCAACCTTCCAATCTTTGGAGTGATTGACACACCATGTTGGA
20 TTGTGAAGGCTGCCCCATCCTGTTCTGAGAAGAAGGGCAACTATGCCTGT
CTGCTGAGGGAGGACCAGGGCTGGTATTGTCAGAATGCTGGCAGCACAG
TCTACTACCCAAATGAGAAGGACTGTGAGACCAGGGGAGACCATGTGTTC
TGTGACACAGCAGCAGGCATCAATGTGGCTGAACAGAGCAAGGAGTGTA
CATCAACATCAGCACCACCAACTACCCATGTAAGGTGAGCACAGGCAGAC
25 ACCCAATCAGTATGGTGGCTCTGAGCCCACTGGGAGCCCTGGTGGCTTGT
TACAAGGGAGTGTCTCTGATGATTGGCAGCAACAGGGTGGGCATCATCAA
GCAACTTAACAAGGGCTGTTCTACATCACCACCAAGGATGCTGACACAGT
GACCATTGACAACACAGTCTACCAACTTAGCAAGGTGGAGGGAGAACAGC
ATGTGATTAAGGGCAGACCTGTGTCCTCCTCCTTTGACCCAATCAAGTTTC
30 CTGAGGACCAGTTCAATGTGGCTCTGGACCAGGTGTTTGAGAACATTGAG
AACAGCCAGGCTCTGGTGGACCAGAGCAACAGGATTCTGTCCTCTGCTGA
GAAGGGCAACACAGGAGGAGGAGGCTCTGGCTACATCCCTGAGGCTCCA

AGGGATGGACAAGCCTATGTGAGGAAGGATGGAGAGTGGGTGCTGCTGA
GCACCTTCCTGGGCAGGTCCTTGAGGTGCTGTTCCAGGGACCTGGACA
CCACCACCACCACCACCACCACTCTGCCTGGAGCCACCCACAGTTTGAGA
AGTAA (SEQ ID NO: 32)

- 5 En determinadas realizaciones, un polipéptido del hMPV comprende una secuencia "armazón" del hMPV expuesta como la SEQ ID NO: 31, y puede contener opcionalmente una o más sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, un polipéptido del hMPV incluye una sustitución de valina, alanina, glicina, isoleucina, leucina o prolina en la posición 185 de la
- 10 SEQ ID NO: 31. En determinadas realizaciones, un polipéptido del hMPV incluye una sustitución de fenilalanina, triptófano o tirosina en la posición 160 de la SEQ ID NO: 31, y/o una sustitución de valina, alanina, glicina, isoleucina, leucina o prolina en la posición 46 de la SEQ ID NO: 31. En determinadas realizaciones, un polipéptido del hMPV incluye una sustitución de arginina en una o ambas
- 15 posiciones 100 y 101 de la SEQ ID NO: 31.

En determinadas realizaciones, un polipéptido del hMPV tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 31.

- 20 En determinadas realizaciones, se proporciona una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia polipeptídica de hMPV, expuesta como:

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGD
VENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRrrRFVLGAIAL
25 GVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNALKTTNEAVSTLGNGVRVLATAVREL
KDFVSKNLTRAINKNKCDIpdLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISL
DLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQ
LPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNK
DCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVALSPL
30 GALVACYKGVSCSIGSNRVGIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEG
EQHVIKGRPVSSSFDPKFPEDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEK
GNTggggsgyipeaprdgqayvrkdgewvllstflgrslevlfqgpgghhhhhhsawshpqfek (SEQ

ID NO: 33) (D185P). (Los aminoácidos en minúscula indican un enlazador, un motivo foldon, un enlazador, un sitio de escisión de 3C-HRV, un enlazador, un marcador 8X-His y una región marcadora de estreptavidina II).

En ciertas realizaciones, se proporciona una secuencia de nucleótidos
5 que codifica una secuencia polipeptídica de hMPV, expuesta como:
ATGAGTTGGAAGGTGGTGATTATCTTCTCCCTGCTGATTACACCACAACAT
GGACTGAAAGAGTCCTACTTGGAGGAGTCCTGTAGCACCATCACAGAGGG
CTACCTGTCTGTGCTGAGGACAGGCTGGTACACCAATGTGTTTCACCTTGG
AGGTGGGAGATGTGGAGAACCTGACTTGTTCTGATGGACCATCCCTGATT
10 AAGACAGAACTGGACCTGACCAAGTCTGCCCTGAGGGAACTGAAAACAGT
GTCTGCTGACCAACTTGCCAGGGAGGAACAGATTGAGAACCCAAGGAGGA
GGAGGTTTGTGCTGGGAGCCATTGCCCTGGGAGTGGCTACAGCAGCAGC
AGTGACAGCAGGAGTGGCTATTGCCAAGACCATCAGATTGGAGTCTGAGG
TGACAGCCATCAAGAATGCCCTGAAAACCACCAATGAGGCTGTGAGCACC
15 CTGGGCAATGGAGTGAGGGTGCTGGCTACAGCAGTGAGGGAACTGAAAG
ACTTTGTGAGCAAGAACCTGACCAGGGCTATCAACAAGAACAAGTGTGAC
ATCCCTGACCTGAAAATGGCTGTGTCCTTCAGCCAGTTCAACAGGAGGTTC
CTGAATGTGGTGAGACAGTTCTCTGACAATGCTGGCATCACACCTGCCATC
TCCCTGGACCTGATGACAGATGCTGAACTGGCAAGGGCTGTGAGCAATAT
20 GCCAACCTCTGCTGGACAAATCAAATGATGTTGGAGAACAGGGGCTATGG
TGAGGAGGAAGGGCTTTGGCATCCTGATTGGAGTCTATGGCTCCTCTGTG
ATTTATATGGTCCAACCTTCCAATCTTTGGAGTGATTGACACACCATGTTGGA
TTGTGAAGGCTGCCCCATCCTGTTCTGAGAAGAAGGGCAACTATGCCTGT
CTGCTGAGGGAGGACCAGGGCTGGTATTGTCAGAATGCTGGCAGCACAG
25 TCTACTACCCAAATGAGAAGGACTGTGAGACCAGGGGAGACCATGTGTTC
TGTGACACAGCAGCAGGCATCAATGTGGCTGAACAGAGCAAGGAGTGTA
CATCAACATCAGCACCACTACCCATGTAAGGTGAGCACAGGCAGAC
ACCCAATCAGTATGGTGGCTCTGAGCCCACTGGGAGCCCTGGTGGCTTGT
TACAAGGGAGTGTCTGTAGCATTGGCAGCAACAGGGTGGGCATCATCAA
30 GCAACTTAACAAGGGCTGTTCTACATACCAACCAGGATGCTGACACAGT
GACCATTGACAACACAGTCTACCAACTTAGCAAGGTGGAGGGAGAACAGC
ATGTGATTAAGGGCAGACCTGTGTCCTCCTCCTTTGACCCAATCAAGTTTC

CTGAGGACCAGTTCAATGTGGCTCTGGACCAGGTGTTTGAGAACATTGAG
AACAGCCAGGCTCTGGTGGACCAGAGCAACAGGATTCTGTCCTCTGCTGA
GAAGGGCAACACAGGAGGAGGAGGCTCTGGCTACATCCCTGAGGCTCCA
AGGGATGGACAAGCCTATGTGAGGAAGGATGGAGAGTGGGTGCTGCTGA
5 GCACCTTCCTGGGCAGGTCCTTGGAGGTGCTGTTCCAGGGACCTGGACA
CCACCACCACCACCACCACCACTCTGCCTGGAGCCACCCACAGTTTGAGA
AGTAA (SEQ ID NO: 34) (D185P).

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

10 ATGTCTTGAAAGTCGTCATCATCTTCTCTCTGCTGATCACCCACAAACAC
GGCCTGAAGGAATCTTATCTGGAAGAGTCCTGCTCCACAATCACAGAGGG
CTACCTGAGCGTGCTGAGAACCGGCTGGTACACCAACGTGTTCACTCTGG
AGGTGGGCGACGTGGAGAACCTGACTTGTAGTGACGGCCCCTCCCTGAT
CAAGACTGAGCTGGACCTGACAAAGAGTGCACTGAGAGAACTCAAGACTG
15 TGTCCGCAGACCAGCTGGCCCGCGAGGAGCAGATCGAAAATCCTAGACA
GTCAAGGTTTCGTCCTGGGAGCCATTGCTCTGGGAGTTGCTACAGCTGCCG
CTGTGACCGCAGGGGTGGCTATTGCTAAAACCATCAGGCTGGAGTCCGAA
GTGACAGCAATCAAGAATGCCCTGAAGACCACCAACGAGGCAGTCTCCAC
ACTGGGCAATGGAGTGAGGGTGCTGGCAACCGCCGTGAGGGAGCTGAAG
20 GACTTCGTGTCCAAGAACCTGACCAGGGCTATCAACAAAAACAAGTGCGA
CATCCCCGATCTGAAGATGGCAGTTAGCTTTTCCCAGTTTAACCGGAGATT
CCTGAATGTGGTTAGACAGTTCAGCGACAACGCCGGGATCACCCCAGCTA
TTTCCCTGGACCTGATGACTGATGCCGAGCTGGCACGGGCTGTGTCCAAT
ATGCCACCAGCGCTGGGCAGATTAAGCTGATGCTGGAGAATCGGGCAAT
25 GGTGAGAAGGAAGGGGTTTGGCATCCTGATCGGCGTGTACGGGTCCTCC
GTGATCTACATGGTGCAGCTGCCTATTTTTGGAGTGATTGATACACCCTGC
TGGATCGTTAAAGCAGCACCCAGCTGCTCCGAGAAGAAGGGCAATTACGC
CTGTCTGCTGCGGGAGGACCAGGGGTGGTACTGCCAGAACGCCGGCTCC
ACAGTGTATTACCCAATGAAAAGGACTGCGAGACAAGGGGAGACCACGT
30 GTTCTGCGACACTGCCGCTGGGATTAATGTGGCCGAGCAGAGCAAGGAGT
GCAACATCAACATTTCCACCACAACTACCCCTGCAAGGTGAGCACCGGC
AGGCACCCTATCTCCATGGTGGCCCTGTCTCCCCTGGGAGCTCTGGTGGC

TTGCTACAAGGGAGTGAGCTGTAGCATCGGGTCCAATAGAGTCGGGATTA
TCAAGCAGCTGAATAAGGGCTGCAGCTATATTACCAACCAGGATGCCGAT
ACTGTGACTATTGACAACACAGTGTATCAGCTGTCAAAGGTGGAAGGCCGA
ACAGCATGTGATCAAAGGACGGCCCGTCAGCAGCTCCTTTGACCCTATCA
5 AATTCCCCGAAGACCAGTTTAACGTGGCACTGGACCAGGTTTTTCGAAAATA
TTGAGAATTCTCAGGCCCTGGTGGACCAGTCTAACCGGATCCTCTCCTCC
GCCGAGAAGGGAAATACAGGCTTTATTATCGTGATCATCCTGATCGCAGTG
CTGGGATCCAGTATGATCCTGGTCTCCATTTTCATCATCATTAAAGAAGACC
AAGAAACCCACTGGCGCACCACTGAACTGAGCGGCGTGACTAACAATGG
10 CTTTATCCCTCACAATTGA (SEQ ID NO: 36) (D185P mRNA).

En determinadas realizaciones, un polipéptido del hMPV tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 33. En determinadas realizaciones, un polipéptido del hMPV comprende la SEQ ID NO: 33. En determinadas realizaciones, un polinucleótido del hMPV tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 34. En determinadas realizaciones, un polinucleótido del hMPV comprende la SEQ ID NO: 34. En determinadas realizaciones, un polinucleótido del hMPV tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 36. En determinadas realizaciones, un polinucleótido del hMPV comprende la SEQ ID NO: 36.

En determinadas realizaciones, se proporciona una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia polipeptídica de hMPV, expuesta como:

MSWKVVIIIFSLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTVFTLEVGDV
ENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRrrRFVLGAIALG
VATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNALKTTNEAVSTLGNGVRVLAfAVRELK
30 DFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISLD
LMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFILIGVYGSSVIYMVQL
PIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNKED

CETRGDHFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVALSPLG
ALVACYKGVSCSIGSNRVGIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEGE
QHVIKGRPVSSSFDPKFPEDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEKG
NTggggsgyipeaprdgqayvrkdgewvllstflgrslevlfqgpgghhhhhhhhsawshpqfek (SEQ

- 5 ID NO: 35) (T160F_N46V). (Los aminoácidos en minúscula indican un enlazador, un motivo foldon, un enlazador, un sitio de escisión de 3C-HRV, un enlazador, un marcador 8X-His y una región marcadora de estreptavidina II).

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

- 10 ATGAGTTGGAAGGTGGTGAATTATCTTCTCCCTGCTGATTACACCACAACAT
GGACTGAAAGAGTCCTACTTGGAGGAGTCCTGTAGCACCATCACAGAGGG
CTACCTGTCTGTGCTGAGGACAGGCTGGTACACAGTGGTGTTCACCTTGG
AGGTGGGAGATGTGGAGAACCTGACTTGTTCTGATGGACCATCCCTGATT
AAGACAGAACTGGACCTGACCAAGTCTGCCCTGAGGGAAGTGAACACAGT
15 GTCTGCTGACCAACTTGCCAGGGAGGAACAGATTGAGAACCCAAGGAGGA
GGAGGTTTGTGCTGGGAGCCATTGCCCTGGGAGTGGCTACAGCAGCAGC
AGTGACAGCAGGAGTGGCTATTGCCAAGACCATCAGATTGGAGTCTGAGG
TGACAGCCATCAAGAATGCCCTGAAAACCAACCAATGAGGCTGTGAGCACC
CTGGGCAATGGAGTGAGGGTGCTGGCTTTTGCTGTGAGGGAACTGAAAGA
20 CTTTGTGAGCAAGAACCTGACCAGGGCTATCAACAAGAACAAGTGTGACAT
TGATGACCTGAAAATGGCTGTGTCCTTCAGCCAGTTCAACAGGAGGTTCTCT
GAATGTGGTGAGACAGTTCTCTGACAATGCTGGCATCACACCTGCCATCTC
CCTGGACCTGATGACAGATGCTGAACTGGCAAGGGCTGTGAGCAATATGC
CAACCTCTGCTGGACAAATCAAATGATGTTGGAGAACAGGGCTATGGTG
25 AGGAGGAAGGGCTTTGGCATCCTGATTGGAGTCTATGGCTCCTCTGTGAT
TTATATGGTCCAACCTTCCAATCTTTGGAGTGATTGACACACCATGTTGGATT
GTGAAGGCTGCCCCATCCTGTTCTGAGAAGAAGGGCAACTATGCCTGTCT
GCTGAGGGAGGACCAGGGCTGGTATTGTCAGAATGCTGGCAGCACAGTC
TACTACCCAAATGAGAAGGACTGTGAGACCAGGGGAGACCATGTGTTCTG
30 TGACACAGCAGCAGGCATCAATGTGGCTGAACAGAGCAAGGAGTGTAACA
TCAACATCAGCACCACCAACTACCCATGTAAGGTGAGCACAGGCAGACAC
CCAATCAGTATGGTGGCTCTGAGCCCACTGGGAGCCCTGGTGGCTTGTTA

CAAGGGAGTGTCTGTAGCATTGGCAGCAACAGGGTGGGCATCATCAAGC
 AACTTAACAAGGGCTGTTCTACATCACCAACCAGGATGCTGACACAGTGA
 CCATTGACAACACAGTCTACCAACTTAGCAAGGTGGAGGGAGAACAGCAT
 GTGATTAAGGGCAGACCTGTGTCCTCCTCCTTTGACCCAATCAAGTTTCCT
 5 GAGGACCAGTTCAATGTGGCTCTGGACCAGGTGTTTGAGAACATTGAGAA
 CAGCCAGGCTCTGGTGGACCAGAGCAACAGGATTCTGTCCTCTGCTGAGA
 AGGGCAACACAGGAGGAGGAGGCTCTGGCTACATCCCTGAGGCTCCAAG
 GGATGGACAAGCCTATGTGAGGAAGGATGGAGAGTGGGTGCTGCTGAGC
 ACCTTCCTGGGCAGGTCCTTGGAGGTGCTGTTCCAGGGACCTGGACACCA
 10 CCACCACCACCACCACCACTCTGCCTGGAGCCACCCACAGTTTGAGAAGT
 AA (SEQ ID NO: 37) (T160F_N46V).

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

ATGAGCTGGAAGGTTGTGATTATTTTCTCTCTGCTGATTACTCCACAGCAC
 15 GGCCTGAAGGAGTCCTACCTGGAGGAGTCCTGTTCTACTATCACTGAGGG
 GTATCTCTCTGTGCTGCGGACAGGGTGGTATACAGTGGTGTTCCACCTGG
 AGGTTGGCGATGTGGAGAATCTGACTTGCAGCGATGGCCCTTCTCTGATC
 AAGACCGAGCTGGATCTGACAAAAAGCGCCCTCAGAGAACTGAAAACCGT
 GTCCGCCGATCAGCTGGCAAGGGAGGAGCAGATCGAGAACCCACGGCAG
 20 AGCAGGTTTGTGCTGGGCGCTATCGCTCTGGGCGTGGCCACTGCAGCTG
 CTGTCACTGCAGGGGTCGCAATCGCTAAGACTATCAGACTGGAATCCGAG
 GTGACCGCCATTAAGAATGCCCTGAAGACTACCAACGAGGCTGTGTCCAC
 TCTGGGAAACGGAGTGAGGGTCCTGGCCTTCGCAGTGAGGGAGCTGAAG
 GATTTTGTGTCAAAGAACCTTACACGGGCCATCAACAAGAATAAGTGCGAT
 25 ATCGATGACCTGAAGATGGCCGTGTCCTTCTCCCAGTTCAACCGGCGCTT
 TCTGAATGTGGTGCGCCAGTTTTCCGACAACGCTGGAATCACCCCTGCTAT
 CAGCCTGGACCTCATGACCGACGCCGAACCTCGCAAGGGCCGTTTCTAACA
 TGCCTACATCCGCTGGACAGATTAAGCTGATGCTGGAGAATAGAGCAATG
 GTGAGGAGAAAGGGATTTCGGCATCCTGATTGGCGTGTACGGATCTAGCGT
 30 GATCTACATGGTGCAGCTGCCGATCTTCGGCGTGATCGATACTCCTTGTTG
 GATCGTCAAGGCCGCCCTTCTGCTCCGAGAAGAAGGGCAATTACGCTT
 GTCTGCTGCGGGAGGACCAGGGCTGGTATTGCCAGAACGCCGGGTCTAC

AGTGTACTATCCTAACGAGAAGGATTGCGAGACCAGAGGGCGACCACGTTT
 TCTGTGATACAGCCGCCGGAATCAATGTCGCAGAGCAGTCTAAGGAGTGC
 AACATCAATATCTCTACAACCAATTACCCATGTAAGGTGAGCACTGGACGG
 CACCCTATCAGTATGGTGGCTCTGAGCCCACTGGGGGCACTGGTGGCTTG
 5 CTACAAGGGGGTGAGCTGCAGTATCGGCAGTAACAGAGTGGGCATTATCA
 AGCAGCTGAACAAAGGGTGCTCTTATATTACAAACCAGGATGCAGATACTG
 TGACCATCGACAACACTGTGTACCAGCTGTCCAAGGTGGAGGGGGGAGCA
 GCATGTGATCAAAGGGAGACCCGTCTCTTCTTCTTTTCGATCCCATCAAGTT
 CCCTGAAGACCAGTTCAATGTTGCCCTGGACCAGGTTTTTCGAGAACATCG
 10 AAAATAGCCAGGCCTTGGTCGATCAATCCAACAGGATCCTGAGCAGCGCA
 GAGAAAGGGAACACTGGCTTCATCATCGTGATCATTCTGATCGCCGTGCT
 GGGGAGCAGTATGATTCTGGTGTCCATTTTCATCATCATCAAGAAGACCAA
 GAAGCCTACAGGAGCACCCCCTGAGCTGAGCGGAGTGACCAACAACGGC
 TTTATCCCTCACAACCTGA (SEQ ID NO: 38) (T160F_N46V).

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

ATGAGCTGGAAGGTTGTGATTATTTTCTCTCTGCTGATTACTCCACAGCAC
 GGCCTGAAGGAGTCCTACCTGGAGGAGTCCTGTTCTACTATCACTGAGGG
 GTATCTCTCTGTGCTGCGGACAGGGTGGTATACAGTGGTGTTCACCCTGG
 20 AGGTTGGCGATGTGGAGAATCTGACTTGCAGCGATGGCCCTTCTCTGATC
 AAGACCGAGCTGGATCTGACAAAAAGCGCCCTCAGAGAACTGAAAACCGT
 GTCCGCCGATCAGCTGGCAAGGGAGGAGCAGATCGAGAACCCACGGCAG
 AGCAGGTTTGTGCTGGGCGCTATCGCTCTGGGCGTGGCCACTGCAGCTG
 CTGTCACTGCAGGGGTCGCAATCGCTAAGACTATCAGACTGGAATCCGAG
 25 GTGACCGCCATTAAGAATGCCCTGAAGACTACCAACGAGGCTGTGTCCAC
 TCTGGGAAACGGAGTGAGGGTCCTGGCCTTCGCAGTGAGGGAGCTGAAG
 GATTTTGTGTCAAAGAACCTTACACGGGCCATCAACAAGAATAAGTGCGAT
 ATCGATGACCTGAAGATGGCCGTGTCCTTCTCCCAGTTCAACCGGCGCTT
 TCTGAATGTGGTGCGCCAGTTTTCCGACAACGCTGGAATCACCCCTGCTAT
 30 CAGCCTGGACCTCATGACCGACGCCGAACCTCGCAAGGGCCGTTTCTAACA
 TGCCTACATCCGCTGGACAGATTAAGCTGATGCTGGAGAATAGAGCAATG
 GTGAGGAGAAAGGGATTTCGGCATCCTGATTGGCGTGTACGGATCTAGCGT

GATCTACATGGTGCAGCTGCCGATCTTCGGCGTGATCGATACTCCTTGTTG
 GATCGTCAAGGCCGCCCTTCCTGCTCCGAGAAGAAGGGCAATTACGCTT
 GTCTGCTGCGGGAGGACCAGGGCTGGTATTGCCAGAACGCCGGGTCTAC
 AGTGTACTATCCTAACGAGAAGGATTGCGAGACCAGAGGCGACCACGTTT
 5 TCTGTGATACAGCCGCCGGAATCAATGTCGCAGAGCAGTCTAAGGAGTGC
 AACATCAATATCTCTACAACCAATTACCCATGTAAGGTGAGCACTGGACGG
 CACCCTATCAGTATGGTGGCTCTGAGCCCACTGGGGGCACTGGTGGCTTG
 CTACAAGGGGGTGAGCTGCAGTATCGGCAGTAACAGAGTGGGCATTATCA
 AGCAGCTGAACAAAGGGTGCTCTTATATTACAAACCAGGATGCAGATACTG
 10 TGACCATCGACAACACTGTGTACCAGCTGTCCAAGGTGGAGGGGGAGCA
 GCATGTGATCAAAGGGAGACCCGTCTCTTCTTCTTCGATCCCATCAAGTT
 CCCTGAAGACCAGTTCAATGTTGCCCTGGACCAGGTTTTTCGAGAACATCG
 AAAATAGCCAGGCCTTGGTCGATCAATCCAACAGGATCCTGAGCAGCGCA
 GAGAAAGGGAACTGGCTTCATCATCGTGATCATTCTGATCGCCGTGCT
 15 GGGGAGCAGTATGATTCTGGTGTCCATTTTCATCATCATCAAGAAGACCAA
 GAAGCCTACAGGAGCACCCCCTGAGCTGAGCGGAGTGACCAACAACGGC
 TTTATCCCTCACAATAA (SEQ ID NO: 39) (T160F_N46V).

En determinadas realizaciones, un polipéptido del hMPV tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un
 20 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 35. En determinadas realizaciones, un polipéptido del hMPV comprende la SEQ ID NO: 35. En determinadas realizaciones, un polinucleótido del hMPV tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la
 25 SEQ ID NO: 37. En determinadas realizaciones, un polinucleótido del hMPV comprende la SEQ ID NO: 37. En determinadas realizaciones, un polinucleótido del hMPV tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 38. En determinadas realizaciones, un
 30 polinucleótido del hMPV comprende la SEQ ID NO: 38. En determinadas realizaciones, un polinucleótido del hMPV tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %

o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 37. En determinadas realizaciones, un polinucleótido del hMPV comprende la SEQ ID NO: 37. En determinadas realizaciones, un polinucleótido del hMPV tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 39. En determinadas realizaciones, un polinucleótido del hMPV comprende la SEQ ID NO: 39.

En general, las posiciones en las construcciones descritas en el presente documento se pueden mapear en una secuencia de referencia, por ejemplo, la secuencia de tipo silvestre de SEQ ID NO: 10 o la secuencia de estructura principal de SEQ ID NO: 31, mediante alineación por pares, por ejemplo, utilizando el algoritmo Needleman-Wunsch con parámetros convencionales (matriz EBLOSUM62, penalización por hueco 10, penalización por extensión de hueco 0.5).

En determinadas realizaciones, las vacunas de la presente divulgación pueden comprender al menos un antígeno proteico F del hMPV. Los antígenos proteicos F del hMPV de la divulgación se pueden preparar mediante una variedad de métodos. En una realización, se utiliza una estirpe celular hospedadora que puede ser de origen eucariota o procariota para la expresión de un polipéptido F del hMPV. En una realización, una estirpe celular hospedadora utilizada para la expresión de un polipéptido F del hMPV es de origen bacteriano. En una realización, una estirpe celular hospedadora utilizada para la expresión de un polipéptido F del hMPV es de origen mamífero. Se pueden determinar estirpes celulares hospedadoras particulares que son las más adecuadas para que el producto génico deseado se exprese en ellas. Las estirpes celulares hospedadoras ilustrativas incluyen, pero sin limitación, DG44 y DUXB11 (estirpes de ovario de hámster chino, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (estirpe de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno T de SV40), CHO (ovario de hámster chino), R1610 (fibroblasto de hámster chino), BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (estirpes de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocitos humanos) y 293 (riñón humano). Las

estirpes celulares hospedadoras suelen estar disponibles en servicios comerciales, en la American Tissue Culture Collection (ATCC) o en la bibliografía publicada.

En determinadas realizaciones, el antígeno proteico F del hMPV se establece como:

MSWKVVIIFSLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGD
VENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAI
ALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNALKTNEAVSTLGNGVRVLATAVR
ELKDFVSKNLTRAINKNKCDIPDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAI
10 SLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYM
VQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPN
EKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVAL
SPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSK
VEGEQHVIGRPVSSSFDPKFPEDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSS
15 AEKGNTGFIIVILIAVLGSSMILVSIFIIKKTKKPTGAPPELSGVTNNGFIPHN
(SEQ ID NO: 40) (A2-D185P).

En determinadas realizaciones, el antígeno proteico F del hMPV está codificado por un ORF de ARNm establecido como (SEQ ID NO: 34) (ORF del ARNm A2-D185P).

20 En determinadas realizaciones, el antígeno proteico F del hMPV está codificado por un ORF de ARNm establecido como (SEQ ID NO: 36) (ORF del ARNm AD185P).

En determinadas realizaciones, el antígeno proteico F del hMPV se establece como:

25 MSWKVVIIFSLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTVFTLEVGDV
ENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIAL
GVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNALKTNEAVSTLGNGVRVLAFVREL
KDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISL
DLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQ
30 LPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEK
DCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVALSPL
GALVACYKGVSCSIGSNRVGIIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEG

EQHVIKGRPVSSSFDPKFPEDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEK
GNTGFIIVILIAVLGSSMILVSIFIIKKTKKPTGAPPELSGVTNNGFIPHN (SEQ ID
NO: 2) (A2-T160F_N46V).

En determinadas realizaciones, el antígeno proteico F del hMPV está
5 codificado por un ORF de ARNm con codones optimizados establecido como:
AUGAGCUGGAAGGUUGUGAUUUAUUUUCUCUCUGCUGAUUACUCCACAG
CACGGCCUGAAGGAGUCCUACCUGGAGGAGUCCUGUUCUACUAUCACU
GAGGGGUAUCUCUCUGUGCUGCGGACAGGGUGGUUAUACAGUGGUGUUC
ACCCUGGAGGUUGGCGAUGUGGAGAAUCUGACUUGCAGCGAUGGCCCU
10 UCUCUGAUCAAGACCGAGCUGGAUCUGACAAAAAGCGCCUCAGAGAAC
UGAAAACCGUGUCCGCCGAUCAGCUGGCAAGGGAGGAGCAGAU CGAGA
ACCCACGGCAGAGCAGGUUUGUGCUGGGCGCUAUCGCUCUGGGCGUGG
CCACUGCAGCUGCUGUCACUGCAGGGGUCGCAAUCGCUAAGACUAUCA
GACUGGAAUCCGAGGUGACCGCCAUUAAGAAUGCCCUGAAGACUACCAA
15 CGAGGCUGUGUCCACUCUGGGAAACGGAGUGAGGGUCCUGGCCUUCGC
AGUGAGGGAGCUGAAGGAUUUUGUGUCAAGAACCUUACACGGGCCAU
CAACAAGAAUAAGUGCGAUAUCAUGACCUGAAGAUGGCCCGUGUCCUUC
UCCCAGUUCAACCGGCGCUUUCUGAAUGUGGUGCGCCAGUUUUCGAC
AACGCUGGAAUCACCCCUGCUAUCAGCCUGGACCUC AUGACCGACGCCG
20 AACUCGCAAGGGCCGUUUCUAACAUGCCUACAUC CGCUGGACAGAUUAA
GCUGAUGCUGGAGAAUAGAGCAAUGGUGAGGAGAAAGGGAUUCGGCAU
CCUGAUUGGCGUGUACGGAUCUAGCGUGAUCUACAUGGUGCAGCUGCC
GAUCUUCGGCGUGAUCGAUACUCCUUGUUGGAUCGUAAGGCCGCCCC
UUCUGUCUCCGAGAAGAAGGGCAAUUACGCUUGUCUGCUGCGGGAGGA
25 CCAGGGCUGGUAAUUGCCAGAACGCCGGGUCUACAGUGUACUAUCCUAA
CGAGAAGGAUUGCGAGACCAGAGGCGACCACGUUUUCUGUGAUACAGC
CGCCGGAAUCA AUGUCGCAGAGCAGUCUAAGGAGUGCAACAUAUAUC
UCUACAACCAAUUACCCAUGUAAGGUGAGCACUGGACGGCACCCUAUCA
GUAUGGUGGCUCUGAGCCCACUGGGGGCACUGGUGGCUUGCUACAAGG
30 GGGUGAGCUGCAGUAUCGGCAGUAACAGAGUGGGCAUUAUCAAGCAGC
UGAACAAAGGGUGCUCUUAUAUAUACAAACCAGGAUGCAGAUACUGUGAC
CAUCGACAACACUGUGUACCAGCUGUCCAAGGUGGAGGGGGAGCAGCA

UGUGAUCAAAGGGAGACCCGUCUCUUCUUCUUUCGAUCCCAUCAAGUUC
 CCUGAAGACCAGUUCAAUGUUGCCCUGGACCAGGUUUUCGAGAACAUCG
 AAAAUAGCCAGGCCUUGGUCGAUCAAUCCAACAGGAUCCUGAGCAGCGC
 AGAGAAAGGGAACACUGGCUUCAUCAUCGUGAUCAUUCUGAUCGCCGUG
 5 CUGGGGAGCAGUAUGAUUCUGGUGUCCAUUUUCAUCAUCAAGAAGA
 CCAAGAAGCCUACAGGAGCACCCCCUGAGCUGAGCGGAGUGACCAACAA
 CGGCUUUAUCCCUACACAACUAA

(SEQ ID NO: 5)

En determinadas realizaciones, el antígeno proteico F del hMPV está
 10 codificado por un ORF de ARNm establecido como (SEQ ID NO: 37) ORF del
 ARNm A2-T160F_N46V).

En determinadas realizaciones, el antígeno proteico F del hMPV está
 codificado por un ORF de ARNm con codones optimizados establecido como
 (SEQ ID NO: 38) ORF del ARNm T160F_N46V).

15 En determinadas realizaciones, el antígeno proteico F del hMPV está
 codificado por un ORF de ARNm con codones optimizados establecido como
 (SEQ ID NO: 39) ORF del ARNm T160F_N46V).

V. Proteína F del hPIV3

hPIV3 es un virus de ARN monocatenario, de sentido negativo, con
 20 envoltura y no segmentado que pertenece a la subfamilia paramixovirinae dentro
 de la familia de los paramixovirus. Es una causa importante de enfermedad
 infantil y hospitalización en todo el mundo. La entrada del hPIV3 requiere la
 fusión de membranas víricas y celulares, que se cataliza con la proteína de
 fusión (F) del hPIV3 en la superficie del virión.

25 F de hPIV3 es una glucoproteína de fusión de clase I, sintetizada como un
 precursor inactivo, F0, que debe escindirse para volverse competente en cuanto
 a la fusión. F0 sufre escisión proteolítica durante el transporte a través del
 aparato de Golgi, generando un heterodímero unido por disulfuro de polipéptidos
 F2 y F1 (F2 aminoterminal a F1). Tres protómeros del heterodímero F2—F1 se
 30 ensamblan para formar una proteína F madura, que adopta una conformación
 metaestable de "prefusión" o "pre-F". Para iniciar la fusión de membranas, la F
 del hPIV3 se activa y experimenta una serie de cambios conformacionales

graduales en la proteína F que impulsan la fusión de la membrana y dan como resultado que la F del hPIV3 adopte una conformación "posfusión" o "post-F" sumamente estable.

En el presente documento se proporcionan polipéptidos antigénicos de hPIV3 que comprenden un polipéptido F de hPIV3. El polipéptido F del hPIV3 puede comprender la secuencia completa de F del hPIV o una parte de F del hPIV. En determinadas realizaciones, la parte es el ectodominio.

Los polipéptidos F del hPIV3 descritos en el presente documento pueden tener eliminaciones o sustituciones con respecto a la proteína F de hPIV3 de tipo silvestre establecidas como:

MLISILSIITTMIMASHCQIDITKLQHVGVLVNSPKGMKISQNFETRYLILSLIPKIE
DSNSCGDQQIKQYKRLLDRLIPLYDGLKLQKDVIVTNQESNENTDPRTERFFG
GVIGTIALGVATSAQITA AVALVEAKQAKSDIEKLKEAIRDTNKAVQSVQSSVGN
LIVAIKSVQDYVNKEIVPSIARLGCEAAGLQLGIALTQH YSELTNIFGDNIGSLQE
KGIKLQGIASLYRTNITEIFTTSTVDKYDIYDLLFTESIKVRVIDVDLNDYSITLQV
RLPLLTRLNLTQIYKVDSISYNIQNREWIPLPSHIMTKGAFLGGADVKECIEAF
SSYICPSDPGFVLNHEMESCLSGNISQCPRTTVTSDIVPRYAFVNGGVVANCIT
TTCTCNGIGNRINQPPDQGVKIITHKECNTIGINGMLFNTNKEGTlafYTPDDIT
LNNSVALDPIDISIELNKA KSDLEESKEWIRRSNQKLDSIGSWHQSSTTIIILIMM
IILFIINITIITIAIKYYRIQKRNRVDQNDKPYVLTNK
(SEQ ID NO: 11).

Por ejemplo, en algunas realizaciones, un polipéptido F del hPIV3 comprende las sustituciones de aminoácidos Q162C, L168C, I213C, G230C, A463V e I474Y con respecto a la SEQ ID NO: 11.

En algunas realizaciones, el trímero del ectodominio F del hPIV3 comprende protómeros que comprenden una o más sustituciones o eliminaciones de aminoácidos que estabilizan el trímero del ectodominio del hPIV3 en una conformación de prefusión, en donde la una o más sustituciones o eliminaciones de aminoácidos comprenden uno o más de los siguientes conjuntos de sustituciones para formar un enlace disulfuro para estabilizar el trímero del ectodominio del hPIV3 en una conformación de prefusión: 162C y 168C; 213C y 230C.

En algunas realizaciones, los protómeros del trímero del ectodominio F del hPIV3 incluyen las posiciones 19 a 481 de F del hPIV3, una sustitución de aminoácidos (tal como K108E) para eliminar el sitio de escisión de furina consenso entre F2 y F1 (si el sitio consenso está presente en la secuencia natural), un enlace disulfuro no natural entre las sustituciones de 162C y 168C (tal como Q162C y L168C) y enlace a un dominio de trimerización GCN4 carboxiterminal (por ejemplo, a través de un enlazador peptídico SA), que estabiliza el trímero del ectodominio F del hPIV3 en una conformación de prefusión. En algunas de dichas realizaciones, los protómeros comprenden además sustituciones de relleno de cavidades 463V y 474Y (tales como A463V e I474Y) para la estabilización en la conformación de prefusión.

En algunas realizaciones, los protómeros del trímero del ectodominio F del hPIV3 incluyen las posiciones 19 a 481 de F del hPIV3, una sustitución de aminoácidos (tal como K108E) para eliminar el sitio de escisión de furina consenso entre F2 y F1 (si el sitio consenso está presente en la secuencia natural), un enlace disulfuro no natural entre las sustituciones de 162C y 168C (tal como Q162C y L168C), un enlace disulfuro no natural entre las sustituciones de 213C y 230C (tal como I213C y G230C) y enlace a un dominio de trimerización GCN4 carboxiterminal (por ejemplo, a través de un enlazador peptídico SA), que estabiliza el trímero del ectodominio F del hPIV3 en una conformación de prefusión. En algunas de dichas realizaciones, los protómeros comprenden además sustituciones de relleno de cavidades 463V y 474Y (tales como A463V e I474Y) para la estabilización en la conformación de prefusión.

En algunas realizaciones, los protómeros del trímero del ectodominio F del hPIV3 incluyen una proteína F del hPIV3 de longitud completa (menos el péptido señal) que comprende una sustitución de aminoácidos (tal como K108E) para eliminar el sitio de escisión de furina consenso entre F2 y F1 (si el sitio de consenso está presente en la secuencia natural) y un enlace disulfuro no natural entre las sustituciones 162C y 168C (tal como Q162C y L168C) que estabilizan el trímero del ectodominio F del hPIV3 en una conformación de prefusión. En algunas de dichas realizaciones, los protómeros comprenden además

sustituciones de relleno de cavidades 463V y 474Y (tales como A463V e I474Y) para la estabilización en la conformación de prefusión.

En algunas realizaciones, los protómeros del trímero del ectodominio F del hPIV3 incluyen una proteína F del hPIV3 de longitud completa (menos el péptido señal) que comprende una sustitución de aminoácidos (tal como K108E) para eliminar el sitio de escisión de furina consenso entre F2 y F1 (si el sitio de consenso está presente en la secuencia natural), un enlace disulfuro no natural entre las sustituciones 162C y 168C (tal como Q162C y L168C) y un enlace disulfuro no natural entre las sustituciones 213C y 230C (tal como I213C y G230C) que estabilizan el trímero del ectodominio F del hPIV3 en una conformación de prefusión. En algunas de dichas realizaciones, los protómeros comprenden además sustituciones de relleno de cavidades 463V y 474Y (tales como A463V e I474Y) para la estabilización en la conformación de prefusión.

En algunas realizaciones, se proporciona una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia polipeptídica F del hPIV3, expuesta como:

MLISILSIITTMIMASHCQIDITKLQHVGVLVNSPKGMKISQNFETRYLILSLIPKIE
DSNSCGDQQIKQYKRLLDRLIPLYDGLKLQKDVIIVTNQESNENTDPRTERFFG
GVIGTIALGVATSAQITA AVALVEAKQAKSDIEKLKEAIRDTNKAVQSVCSVGN
CIVAIKSVQDYVNKEIVPSIARLGCEAAGLQLGIALTQH YSELTNCFGDNIGSLQ
EKG IKLQCIASLYRTNITEIFTTSTVDKYDIYDLLFTESIKVRVIDVDLNDYSITLQV
RLPLLTRLLNTQIYKVDSISYNIQNREWIPLPSHIMTKGAFLGGADVKECIEAF
SSYICPSDPGFVLNHEMESCLSGNISQCPRTTVTSDIVPRYAFVNGGVVANCIT
TTCTCNGIGNRINQPPDQGVKIITHKECNTIGINGMLFNTNKEGTlafYTPDDIT
LNNSVALDPIDISIELNKVKSDLEESKEWYRRSNQKLDSIGSWHQSSTTIIILIM
MIILFIINITIITIAIKYYRIQKRNRVDQNDKPYVLTNK
(SEQ ID NO: 3)

En algunas realizaciones, se proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de polipéptido F del hPIV3 con codones optimizados, expuesta como:

ATGCTGATTAGCATTCTGTCCATCATCACAACCATGATTATGGCAAGTCACT
GTCAGATCGATATCACCAAGCTCCAGCACGTGGGCGTGCTGGTGAATTCC
CCAAAGGGGATGAAGATTTCTCAGAACTTTGAGACTCGGTACCTGATCCTG

TCCCTGATTCTAAGATTGAGGATAGCAACTCCTGTGGCGACCAGCAGAT
CAAACAGTACAAACGCCTGCTGGACAGACTGATCATCCCACTGTACGACG
GCCTGAAGCTGCAGAAAGACGTCATTGTTACAAACCAGGAAAGCAACGAG
AATACCGACCCTAGGACTGAGCGGTTCTTCGGGGGCGTCATCGGAACAAT
5 CGCACTGGGCGTTGCCACTAGCGCACAGATCACCGCCGCCGTTGCACTG
GTGGAGGCTAAGCAGGCAAAATCTGACATCGAGAAGCTGAAAGAAGCTAT
CCGCGATACCAACAAGGCCGTGCAGTCAGTGTGCTCCAGCGTCGGCAACT
GCATCGTTGCTATTAAGTCCGTGCAGGACTACGTGAACAAGGAGATCGTG
CCCAGTATCGCAAGGCTGGGATGTGAGGCCGCTGGACTGCAGTTGGGGA
10 TCGCTCTCACCCAGCACTACTCCGAGCTGACAAATTGCTTCGGAGATAACA
TCGGATCTCTGCAGGAGAAGGGCATCAAATGCAGTGTATTGCCTCCCTG
TACAGAACAATATCACAGAGATTTTCACAACCAGCACTGTGACAAATAT
GATATCTATGACCTGCTGTTACCGAGTCCATTAAGGTGCGGGTCATCGAC
GTTGACCTGAACGATTATTCCATCACCTCCAGGTGAGACTGCCTCTGCTG
15 ACACGGCTGCTGAACACTCAGATCTACAAGGTCGACTCCATCAGCTACAA
CATCCAGAACCGCGAGTGGTACATCCCACTGCCTAGCCACATCATGACAA
AGGGCGCTTTTCTGGGAGGAGCTGATGTGAAGGAATGCATTGAGGCCTTC
AGCAGCTACATCTGCCCTTCCGATCCCGGCTTCGTCCTGAACCACGAGAT
GGAGAGCTGTCTGAGCGGGAACATTAGCCAGTGCCCCAGGACAACCGTC
20 ACCTCTGACATTGTGCCAAGGTATGCCTTCGTGAACGGCGGAGTGGTTGC
CAATTGCATCACCCTACATGCACTTGCAATGGGATTGGCAACAGGATCAA
CCAGCCACCAGACCAGGGGGTGAAAATCATTACACACAAAGAGTGCAACA
CCATCGGCATCAACGGAATGCTGTTCAATACCAACAAGGAGGGCACCCCTG
GCCTTCTACACACCCGATGACATCACCTGAACAATAGCGTGGCTCTGGA
25 TCCCATTGATATCAGCATTGAGCTGAATAAGGTCAAGTCTGATCTGGAGGA
GAGCAAGGAGTGGTATAGACGGTCTAATCAGAAGCTCGACTCTATCGGAT
CCTGGCACCAGTCCTCCACAACAATCATCATTATCCTGATCATGATGATCA
TCCTGTTTCATCATCAACATCACAATTATCACCATTGCCATCAAGTATTACCG
GATTCAGAAGCGGAATCGCGTTGACCAGAACGACAAACCTTATGTTCTGAC
30 CAACAAATAA

(SEQ ID NO: 14)

En algunas realizaciones, el polipéptido F del hPIV3 comprende una secuencia que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99.5 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO: 3 y 11.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido F del hPIV3 comprende un polipéptido F del hPIV3 modificado que tiene al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99.5 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO: 3 y 11, en donde el polipéptido F del hPIV3 es antigénico.

10 En algunas realizaciones, el polipéptido F del hPIV3 comprende solo la parte del ectodominio de la proteína F.

En el presente documento se proporcionan ARN (p. ej., ARNm) que codifican polipéptidos F antigénicos del hPIV3.

15 En un aspecto, la divulgación proporciona una vacuna contra hPIV3 que comprende un ARNm que comprende un marco abierto de lectura (ORF) que codifica un antígeno proteico F del hPIV3, en donde el antígeno proteico F del hPIV3 comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99.5 % de identidad con la SEQ ID NO: 3 o consiste en una
20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En general, las posiciones en las construcciones descritas en el presente documento se pueden mapear a la secuencia de tipo silvestre de SEQ ID NO: 11 mediante alineamiento por pares, por ejemplo, utilizando el algoritmo Needleman-Wunsch con parámetros convencionales (matriz EBLOSUM62,
25 penalización por hueco 10, penalización por extensión de hueco 0.5). Véase también la discusión sobre alineación estructural proporcionada en el presente documento como un enfoque alternativo para identificar posiciones correspondientes.

30 En algunas realizaciones, el antígeno proteico F del hPIV3 está codificado por un ORF de ARNm con codones optimizados establecido como:
AUGCUGAUUAGCAUUCUGUCCAUCACAACCAUGAUUAUGGCAAGUC
ACUGUCAGAUCAUAUCACCAAGCUCCAGCACGUGGGCGUGCUGGUGA

AUUCCCCAAAGGGGAUGAAGAUUUCUCAGAACUUUGAGACUCGGUACCU
 GAUCCUGUCCCUGAUUCCUAAGAUUGAGGAUAGCAACUCCUGUGGCGA
 CCAGCAGAUCAAACAGUACAAACGCCUGCUGGACAGACUGAUCAUCCCA
 CUGUACGACGGCCUGAAGCUGCAGAAAGACGUCAUUGUUACAAACCAGG
 5 AAAGCAACGAGAAUACCGACCCUAGGACUGAGCGGUUCUUCGGGGGCG
 UCAUCGGAACAAUCGCACUGGGGCGUUGCCACUAGCGCACAGAUACCCG
 CGCCGUUGCACUGGUGGAGGCUAAGCAGGCAAAAUCUGACAUCGAGAA
 GCUGAAAGAAGCUAUCCGCGAUACCAACAAGGCCGUGCAGUCAGUGUGC
 UCCAGCGUCGGCAACUGCAUCGUUGCUAUUAAGUCCGUGCAGGACUAC
 10 GUGAACAAGGAGAUUCGUGCCCAGUAUCGCAAGGCUGGGAUGUGAGGCC
 GCUGGACUGCAGUUGGGGAUCGCUCUCACCCAGCACUACUCCGAGCUG
 ACAAUUGCUUCGGAGAUACAUCGGAUCUCUGCAGGAGAAGGGCAUCA
 AACUGCAGUGUAUUGCCUCCCUGUACAGAACAAUAUCACAGAGAUUUU
 CACAACCAGCACUGUCGACAAAUAUGAUUAUCUAUGACCUGCUGUUCACC
 15 GAGUCCAUAAGGUGCGGGUCAUCGACGUUGACCUGAACGAUUAUUC
 AUCACCCUCCAGGUGAGACUGCCUCUGCUGACACGGCUGCUGAACACU
 CAGAUCAACAAGGUCGACUCCAUCAGCUACAACAUAUCCAGAACCGCGAGU
 GGUACAUCCCACUGCCUAGCCACAUAUGACAAAGGGCGCUUUUCUGG
 GAGGAGCUGAUGUGAAGGAAUGCAUUGAGGCCUUCAGCAGCUACAUCU
 20 GCCCUUCCGAUCCC GGCUUCGUCCUGAACCACGAGAUGGAGAGCUGUC
 UGAGCGGGAACAUAUAGCCAGUGCCCCAGGACAACCGUCACCUCUGACAU
 UGUGCCAAGGU AUGCCUUCGUGAACGGCGGAGUGGUUGCCAUAUUGCAU
 CACCACUACAUGCACUUGCAAUGGGAUUGGCAACAGGAUCAACCAGCCA
 CCAGACCAGGGGGUGAAAAUCAUUAACACACAAAGAGUGCAACACCAUCG
 25 GCAUCAACGGAAUGCUGUUAUACCAACAAGGAGGGCACCCUGGCCU
 CUACACACCCGAUGACAUCACCCUGAACAAUAGCGUGGCUCUGGAUCCC
 AUUGAUUAUCAGCAUUGAGCUGAAUAAGGUCAAGUCUGAUCUGGAGGAGA
 GCAAGGAGUGGUUAUAGACGGUCUAAUCAGAAGCUCGACUCUAUCGGAUC
 CUGGCACCAGUCCUCCACAACAUAUCAUUAUCCUGAUCAUGAUGAUC
 30 AUCCUGUUAUCAUCAACAUCACAUAUACCAUUGCCAUCAAGUAUUA
 CCGGAUUCAGAAGCGGAUCGCGUUGACCAGAACGACAAACCUUAUGUU
 CUGACCAACAAAUAA

(SEQ ID NO: 6)

Los polipéptidos F recombinantes del hPIV3 se describen con más detalle en la patente de EE. UU. n.º 11,078,239, que se incorpora en el presente documento como referencia.

5 **VI. Composiciones combinadas de vacunas de ARNm respiratorio**

En el presente documento se proporcionan composiciones que se dirigen a dos o más de los tres patógenos respiratorios más comunes asociados con una alta morbilidad y mortalidad en bebés, niños y adultos mayores: hRSV, hMPV y hPIV3. Estos patógenos respiratorios tienen una carga de morbilidad combinada superior a la de la gripe. Sin vacunas ni terapias específicas disponibles actualmente, existe una necesidad insatisfecha de una vacuna combinada de ARNm segura, eficaz y conveniente para proteger a las personas contra estos patógenos.

En algunas realizaciones, la composición comprende al menos dos ARNm, en donde los al menos dos ARNm comprenden un marco abierto de lectura (ORF) que codifica un polipéptido antigénico de la proteína F recombinante seleccionado del grupo que consiste en: (i) un primer ARNm que codifica un antígeno proteico F del hRSV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (ii) un segundo ARNm que codifica un antígeno proteico F del hMPV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (iii) un tercer ARNm que codifica un antígeno proteico F del hPIV3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, la composición anterior comprende al menos dos ARNm, en donde los al menos dos ARNm comprenden un ORF que codifica un polipéptido antigénico de la proteína F recombinante que comprende: (i) un primer ARNm que codifica un antígeno proteico F del hRSV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y (ii) un segundo ARNm que codifica un antígeno proteico F del hMPV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, la composición comprende al menos dos ARNm, en donde los al menos dos ARNm comprenden un ORF que codifica un polipéptido antigénico de la proteína F recombinante que comprende: (i) un

primer ARNm que codifica un antígeno proteico F del hRSV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y (ii) un segundo ARNm que codifica un antígeno proteico F del hPIV3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

5 En algunas realizaciones, la composición comprende al menos dos ARNm, en donde los al menos dos ARNm comprenden un ORF que codifica un polipéptido antigénico de la proteína F recombinante que comprende: (i) un primer ARNm que codifica un antígeno proteico F del hMPV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (ii) un segundo ARNm que
10 codifica un antígeno proteico F del hPIV3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.

 En algunas realizaciones, la composición comprende al menos tres ARNm, en donde los al menos tres ARNm comprenden un ORF que codifica un polipéptido antigénico de la proteína F recombinante que comprende: (i) un
15 primer ARNm que codifica un antígeno proteico F del hRSV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y (ii) un segundo ARNm que codifica un antígeno proteico F del hMPV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (ii) un segundo ARNm que codifica un antígeno proteico F del hPIV3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID
20 NO: 3.

 En algunas realizaciones, la composición comprende tres ARNm, en donde los tres ARNm comprenden un ORF que codifica un polipéptido antigénico de la proteína F recombinante que incluye: (i) un primer ARNm que codifica un antígeno proteico F del hRSV que comprende una secuencia de aminoácidos de
25 SEQ ID NO: 1; y (ii) un segundo ARNm que codifica un antígeno proteico F del hMPV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (ii) un segundo ARNm que codifica un antígeno proteico F del hPIV3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

 En algunas realizaciones, la composición comprende tres ARNm, en
30 donde: (i) un primer ARNm codifica un antígeno proteico F del hRSV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (ii) un segundo ARNm codifica un antígeno proteico F del hMPV que comprende una secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (iii) un tercer ARNm codifica un antígeno proteico F del hPIV3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, la composición comprende tres ARNm, en donde: (i) un primer ARNm codifica un antígeno proteico F del hRSV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (ii) un segundo ARNm codifica un antígeno proteico F del hMPV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (iii) un tercer ARNm codifica un antígeno proteico F del hPIV3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, en donde el primer ARNm, el segundo ARNm y el tercer ARNm se formulan en la misma LNP que comprende: OF-02, cKK-E10, GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1, GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 o IM-001 en una proporción molar del 40 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %; colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y DOPE en una proporción molar del 30 %.

En algunas realizaciones, la composición comprende un primer ARNm y un segundo ARNm, en donde: (i) el primer ARNm codifica un antígeno proteico F del hRSV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y (ii) el segundo ARNm codifica un antígeno proteico F del hMPV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en donde el primer ARNm y el segundo ARNm se formulan en la misma LNP que comprende: OF-02, cKK-E10, GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1, GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 o IM-001. Esta composición se puede administrar con una composición separada que comprende un antígeno proteico F del hPIV3. El antígeno proteico F del hPIV3 puede comprender una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, la composición comprende un primer ARNm y un segundo ARNm, en donde: (i) el primer ARNm codifica un antígeno proteico F del hRSV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y (ii) el segundo ARNm codifica un antígeno proteico F del hMPV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en donde el primer ARNm y el segundo ARNm se formulan en una LNP separada que comprende: OF-02, cKK-

E10, GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1, GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 o IM-001. Esta composición se puede administrar con una composición separada que comprende un antígeno proteico F del hPIV3. El antígeno proteico F del hPIV3 puede comprender una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, la composición comprende un primer ARNm y un segundo ARNm, en donde: (i) el primer ARNm codifica un antígeno proteico F del hRSV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y (ii) el segundo ARNm codifica un antígeno proteico F del hMPV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en donde el primer ARNm y el segundo ARNm se formulan en la misma LNP que comprende: OF-02, cKK-E10, GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1, GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 o IM-001 en una proporción molar del 40 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %; colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y DOPE en una proporción molar del 30 %. Esta composición se puede administrar con una composición separada que comprende un antígeno proteico F del hPIV3. El antígeno proteico F del hPIV3 puede comprender una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, la composición comprende un primer ARNm y un segundo ARNm, en donde: (i) el primer ARNm codifica un antígeno proteico F del hRSV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y (ii) el segundo ARNm codifica un antígeno proteico F del hMPV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en donde el primer ARNm y el segundo ARNm se formulan en una LNP separada que comprende: OF-02, cKK-E10, GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1, GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 o IM-001 en una proporción molar del 40 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %; colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y DOPE en una proporción molar del 30 %. Esta composición se puede administrar con una composición separada que comprende un antígeno proteico F del hPIV3. El antígeno proteico F del hPIV3 puede comprender una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, la composición comprende un primer ARNm y un segundo ARNm, en donde: (i) el primer ARNm codifica un antígeno proteico F del hRSV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y (ii) el segundo ARNm codifica un antígeno proteico F del hMPV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en donde el primer ARNm y el segundo ARNm se formulan en la misma LNP que comprende GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10. Esta composición se puede administrar con una composición separada que comprende un antígeno proteico F del hPIV3. El antígeno proteico F del hPIV3 puede comprender una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, la composición comprende un primer ARNm y un segundo ARNm, en donde: (i) el primer ARNm codifica un antígeno proteico F del hRSV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y (ii) el segundo ARNm codifica un antígeno proteico F del hMPV que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en donde el primer ARNm y el segundo ARNm se formulan en una LNP separada que comprende GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10. Esta composición se puede administrar con una composición separada que comprende un antígeno proteico F del hPIV3. El antígeno proteico F del hPIV3 puede comprender una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender la proteína F del hRSV con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una proteína F del hMPV con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 2.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una proteína F del hPIV3 con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender un ARNm que codifica un antígeno proteico F del hRSV con una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 80 %, un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 4.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender un ARNm que codifica un antígeno proteico F del hMPV con una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 80 %, un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 5.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender un ARNm que codifica un antígeno proteico F del hPIV3 con una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 80 %, un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 6.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender al menos un polipéptido antigénico de la proteína F que es una proteína de prefusión.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender al menos un ORF de ARNm que tiene codones optimizados.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender al menos un ARNm que comprende al menos una región no traducida en 5' (5' UTR), al menos una región no traducida en 3' (3' UTR) y al menos una secuencia de poliadenilación (poli(A)).

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender al menos un ARNm que comprende una 5' UTR con una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 7.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender al menos un ARNm que comprende una 3' UTR con una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 8.

- 5 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender al menos un ARNm que tiene al menos una modificación química.

Las composiciones de cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95% o el 100% de los nucleótidos de uracilo en al menos uno de los ARNm que están modificados químicamente.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95% o el 100% de los nucleótidos de uracilo en al menos uno de los ORF que están modificados químicamente.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender modificaciones químicas seleccionadas del grupo que consiste en pseudouridina, N1-metilpseudouridina, 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitosina, 2-tio-l-metil-1-deaza-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-metiluridina.

- 25 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender modificaciones químicas seleccionadas del grupo que consiste en pseudouridina, N1-metilpseudouridina, 5-metilcitosina, 5-metoxiuridina y una combinación de las mismas.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores puede comprender la modificación química N1-metilpseudouridina.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm que codifica un antígeno proteico F del hRSV, ARNm que

codifica un antígeno proteico F del hMPV y ARNm que codifica un antígeno proteico F del hPIV3 que no están unidos covalentemente entre sí.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm que codifica un antígeno proteico F del hRSV, ARNm que
5 codifica un antígeno proteico F del hMPV y/o ARNm que codifica un antígeno proteico F del hPIV3 que están unidos covalentemente entre sí.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm que codifica un antígeno proteico F del hRSV, ARNm que
10 codifica un antígeno proteico F del hMPV y ARNm que codifica un antígeno proteico F del hPIV3, cada uno formulado en una nanopartícula lipídica (LNP) separada.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm que codifica un antígeno proteico F del hRSV, ARNm que
15 codifica un antígeno proteico F del hMPV y ARNm que codifica un antígeno proteico F del hPIV3 formulado en la misma LNP.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una LNP, en donde la LNP comprende al menos un lípido catiónico.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una LNP, en donde el lípido catiónico es biodegradable.

20 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una LNP, en donde el lípido catiónico no es biodegradable.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una LNP, en donde el lípido catiónico es escindible.

25 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una LNP, en donde el lípido catiónico no es escindible.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores puede comprender una LNP, en donde el lípido catiónico se selecciona del grupo que consiste en OF-02, cKK-E10, GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1, GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 y IM-001.

30 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una LNP, en donde el lípido catiónico es cKK-E10.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una LNP, en donde el lípido catiónico es GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10.

5 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una LNP, en donde el lípido catiónico es IM-001.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una LNP, en donde la LNP comprende además un lípido conjugado con polietilenglicol (PEG) (PEGilado), un lípido basado en colesterol y un lípido auxiliar.

10 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una LNP, en donde la LNP está compuesta por: un lípido catiónico en una proporción molar del 35 % al 55 %; un lípido conjugado con polietilenglicol (PEG) (PEGilado) en una proporción molar del 0.25 % al 2.75 %; un lípido basado en colesterol en una proporción molar del 20 % al 45 %; y un lípido
15 auxiliar en una proporción molar del 5 % al 35 %, en donde todas las proporciones molares son respecto al contenido total de lípidos de la LNP.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una LNP, en donde la LNP está compuesta por: un lípido catiónico en una proporción molar del 40 %; un lípido PEGilado en una proporción molar
20 del 1.5 %; un lípido basado en colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y un lípido auxiliar en una proporción molar del 30 %, en donde todas las proporciones molares son respecto al contenido total de lípidos de la LNP.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una LNP, en donde el lípido PEGilado es dimiristoil-PEG2000
25 (DMG-PEG2000) o 2-[(polietilenglicol)-2000]-N,N-ditetradecilacetamida (ALC-0159).

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una LNP, en donde el lípido basado en colesterol es colesterol.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden
30 comprender una LNP, en donde el lípido auxiliar es 1,2-dioleoil-SN-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) o 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC).

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una LNP, en donde la LNP está compuesta por: GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 en una proporción molar del 40 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %; colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y
5 DOPE en una proporción molar del 30 %, en donde todas las proporciones molares son respecto al contenido total de lípidos de la LNP.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una LNP, en donde la LNP está compuesta por: cKK-E10 en una proporción molar del 40 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %;
10 colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y DOPE en una proporción molar del 30 %, en donde todas las proporciones molares son respecto al contenido total de lípidos de la LNP.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una LNP, en donde la LNP está compuesta por: IM-001 en una proporción molar del 40 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %;
15 colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y DOPE en una proporción molar del 30 %, en donde todas las proporciones molares son respecto al contenido total de lípidos de la LNP.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una LNP, en donde la LNP tiene un diámetro promedio de 30 nm a
20 200 nm.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una LNP, en donde la LNP tiene un diámetro promedio de 80 nm a
150 nm.

25 La sección VII de la memoria descriptiva describe además LNP que se pueden formular con las composiciones combinadas de ARNm respiratorio analizadas anteriormente y que se incorporan en el presente documento.

VI.A. Proporciones de ARNm de hRSV, hMPV y hPIV3

Como se analiza en los ejemplos, se investigó *in vitro* e *in vivo* la
30 compatibilidad del ARNm del hRSV prefusión, el ARNm del hMPV prefusión y el ARNm del hPIV3 prefusión. Los estudios demostraron que cuando se coformularon o coadministraron ARNm del hRSV prefusión, ARNm del hMPV

5 prefusión y ARNm del hPIV3 prefusión en una proporción de 1:1:1, se produjo una supresión de la expresión de la proteína del hMPV *in vitro* y de la inmunogenia del hMPV en ratones en relación con la inmunización monovalente con hMPV. Se determinó que la interferencia entre los componentes de las composiciones puede haber ocurrido al nivel de expresión del ARNm sin ningún componente de inmunodominancia.

10 Para determinar si la inhibición de la inmunogenia del hMPV podría superarse con ajustes de dosis alterando la proporción de los ARNm de hRSV, hMPV y hPIV3 prefusión en la coformulación y la coadministración, se exploraron una variedad de proporciones de hRSV, hMPV y hPIV3. Tanto los estudios de coformulación como de coadministración demostraron que el aumento de las dosis de ARNm del hMPV supera la interferencia sin afectar negativamente la inmunogenia del hRSV o del hPIV3, mientras que la disminución de las dosis del ARNm de hPIV3 no supera la interferencia.

15 En consecuencia, la proporción de ARNm del hRSV, ARNm del hMPV y/o ARNm del hPIV3 en vacunas combinadas es importante para la eficacia de la vacuna.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una proporción de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 (p/p) de
20 aproximadamente 1:1:1, 1:1.1:1, 1:1.2:1, 1:1.3:1, 1:1.4:1, 1:1.5:1, 1:1.6:1, 1:1.7:1, 1:1.8:1, 1:1.9:1, 1:2:1, 1:2.1:1, 1:2.2:1, 1:2.3:1, 1:2.4:1, 1:2.5:1, 1:2.6:1, 1:2.7:1, 1:2.8:1, 1:2.9:1, 1:3:1, 1:3.1:1, 1:3.2:1, 1:3.3:1, 1:3.4:1, 1:3.5:1, 1:3.6:1, 1:3.7:1, 1:3.8:1, 1:3.9:1, 1:4:1, 1:4.1:1, 1:4.2:1, 1:4.3:1, 1:4.4:1, 1:4.5:1, 1:4.6:1, 1:4.7:1, 1:4.8:1, 1:4.9:1, 1:5:1, 1:5.1:1, 1:5.2:1, 1:5.3:1, 1:5.4:1, 1:5.5:1, 1:5.6:1,
25 1:5.7:1, 1:5.8:1, 1:5.9:1, 1:6:1, 1:6.1:1, 1:6.2:1, 1:6.3:1, 1:6.4:1, 1:6.5:1, 1:6.6:1, 1:6.7:1, 1:6.8:1, 1:6.9:1, 1:7:1, 1:7.1:1, 1:7.2:1, 1:7.3:1, 1:7.4:1, 1:7.5:1, 1:7.6:1, 1:7.7:1, 1:7.8:1, 1:7.9:1, 1:8:1, 1:8.1:1, 1:8.2:1, 1:8.3:1, 1:8.4:1, 1:8.5:1, 1:8.6:1, 1:8.7:1, 1:8.8:1, 1:8.9:1, 1:9:1, 1:9.1:1, 1:9.2:1, 1:9.3:1, 1:9.4:1, 1:9.5:1, 1:9.6:1, 1:9.7:1, 1:9.8:1, 1:9.9:1, 1:10:1, 1:1:0.9, 1:1:0.8, 1:1:0.7, 1:1:0.6, 1:1:0.5, 1:1:0.4,
30 1:1:0.3, 1:1:0.2, 1:1:0.1.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una proporción de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 (p/p) de 1:1:1,

1:1.1:1, 1:1.2:1, 1:1.3:1, 1:1.4:1, 1:1.5:1, 1:1.6:1, 1:1.7:1, 1:1.8:1, 1:1.9:1, 1:2:1,
 1:2.1:1, 1:2.2:1, 1:2.3:1, 1:2.4:1, 1:2.5:1, 1:2.6:1, 1:2.7:1, 1:2.8:1, 1:2.9:1, 1:3:1,
 1:3.1:1, 1:3.2:1, 1:3.3:1, 1:3.4:1, 1:3.5:1, 1:3.6:1, 1:3.7:1, 1:3.8:1, 1:3.9:1, 1:4:1,
 1:4.1:1, 1:4.2:1, 1:4.3:1, 1:4.4:1, 1:4.5:1, 1:4.6:1, 1:4.7:1, 1:4.8:1, 1:4.9:1, 1:5:1,
 5 1:5.1:1, 1:5.2:1, 1:5.3:1, 1:5.4:1, 1:5.5:1, 1:5.6:1, 1:5.7:1, 1:5.8:1, 1:5.9:1, 1:6:1,
 1:6.1:1, 1:6.2:1, 1:6.3:1, 1:6.4:1, 1:6.5:1, 1:6.6:1, 1:6.7:1, 1:6.8:1, 1:6.9:1, 1:7:1,
 1:7.1:1, 1:7.2:1, 1:7.3:1, 1:7.4:1, 1:7.5:1, 1:7.6:1, 1:7.7:1, 1:7.8:1, 1:7.9:1, 1:8:1,
 1:8.1:1, 1:8.2:1, 1:8.3:1, 1:8.4:1, 1:8.5:1, 1:8.6:1, 1:8.7:1, 1:8.8:1, 1:8.9:1, 1:9:1,
 1:9.1:1, 1:9.2:1, 1:9.3:1, 1:9.4:1, 1:9.5:1, 1:9.6:1, 1:9.7:1, 1:9.8:1, 1:9.9:1, 1:10:1,
 10 1:1:0.9, 1:1:0.8, 1:1:0.7, 1:1:0.6, 1:1:0.5, 1:1:0.4, 1:1:0.3, 1:1:0.2, 1:1:0.1.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una proporción de ARNm de hRSV:hMPV (p/p) de aproximadamente 1:1, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9, 1:2, 1:2.1, 1:2.2, 1:2.3, 1:2.4, 1:2.5, 1:2.6, 1:2.7, 1:2.8, 1:2.9, 1:3, 1:3.1, 1:3.2,
 15 1:3.3, 1:3.4, 1:3.5, 1:3.6, 1:3.7, 1:3.8, 1:3.9, 1:4, 1:4.1, 1:4.2, 1:4.3, 1:4.4, 1:4.5, 1:4.6, 1:4.7, 1:4.8, 1:4.9, 1:5, 1:5.1, 1:5.2, 1:5.3, 1:5.4, 1:5.5, 1:5.6, 1:5.7, 1:5.8, 1:5.9, 1:6, 1:6.1, 1:6.2, 1:6.3, 1:6.4, 1:6.5, 1:6.6, 1:6.7, 1:6.8, 1:6.9, 1:7, 1:7.1, 1:7.2, 1:7.3, 1:7.4, 1:7.5, 1:7.6, 1:7.7, 1:7.8, 1:7.9, 1:8, 1:8.1, 1:8.2, 1:8.3, 1:8.4, 1:8.5, 1:8.6, 1:8.7, 1:8.8, 1:8.9, 1:9, 1:9.1, 1:9.2, 1:9.3, 1:9.4, 1:9.5, 1:9.6, 1:9.7,
 20 1:9.8, 1:9.9, 1:10.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una proporción de ARNm de hRSV:hMPV (p/p) de 1:1, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9, 1:2, 1:2.1, 1:2.2, 1:2.3, 1:2.4, 1:2.5, 1:2.6, 1:2.7, 1:2.8, 1:2.9, 1:3, 1:3.1, 1:3.2, 1:3.3, 1:3.4, 1:3.5, 1:3.6, 1:3.7, 1:3.8, 1:3.9, 1:4, 1:4.1, 1:4.2, 1:4.3, 1:4.4, 1:4.5, 1:4.6, 1:4.7, 1:4.8, 1:4.9, 1:5, 1:5.1, 1:5.2, 1:5.3, 1:5.4, 1:5.5, 1:5.6, 1:5.7, 1:5.8, 1:5.9, 1:6, 1:6.1, 1:6.2, 1:6.3, 1:6.4, 1:6.5, 1:6.6, 1:6.7, 1:6.8, 1:6.9, 1:7, 1:7.1, 1:7.2, 1:7.3, 1:7.4, 1:7.5, 1:7.6, 1:7.7, 1:7.8, 1:7.9, 1:8, 1:8.1, 1:8.2, 1:8.3, 1:8.4, 1:8.5, 1:8.6, 1:8.7, 1:8.8, 1:8.9, 1:9, 1:9.1, 1:9.2, 1:9.3, 1:9.4, 1:9.5, 1:9.6, 1:9.7, 1:9.8, 1:9.9, 1:10.

30 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una proporción de ARNm de hMPV:hPIV3 (p/p) de aproximadamente 1:1, 1:1.1, 1:2:1, 1:3:1, 1:4:1, 1:5:1, 1:6:1, 1:7:1, 1:8:1, 1:9:1,

2:1, 2.1:1, 2.2:1, 2.3:1, 2.4:1, 2.5:1, 2.6:1, 2.7:1, 2.8:1, 2.9:1, 3:1, 3.1:1, 3.2:1, 3.3:1, 3.4:1, 3.5:1, 3.6:1, 3.7:1, 3.8:1, 3.9:1, 4:1, 4.1:1, 4.2:1, 4.3:1, 4.4:1, 4.5:1, 4.6:1, 4.7:1, 4.8:1, 4.9:1, 5:1, 5.1:1, 5.2:1, 5.3:1, 5.4:1, 5.5:1, 5.6:1, 5.7:1, 5.8:1, 5.9:1, 6:1, 6.1:1, 6.2:1, 6.3:1, 6.4:1, 6.5:1, 6.6:1, 6.7:1, 6.8:1, 6.9:1, 7:1, 7.1:1, 7.2:1, 7.3:1, 7.4:1, 7.5:1, 7.6:1, 7.7:1, 7.8:1, 7.9:1, 8:1, 8.1:1, 8.2:1, 8.3:1, 8.4:1, 8.5:1, 8.6:1, 8.7:1, 8.8:1, 8.9:1, 9:1, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 9.8:1, 9.9:1, 10:1, 1:0.9, 1:0.8, 1:0.7, 1:0.6, 1:0.5, 1:0.4, 1:0.3, 1:0.2, 1:0.1.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una proporción de ARNm de hMPV:hPIV3 (p/p) de 1:1, 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1, 1.6:1, 1.7:1, 1.8:1, 1.9:1, 2:1, 2.1:1, 2.2:1, 2.3:1, 2.4:1, 2.5:1, 2.6:1, 2.7:1, 2.8:1, 2.9:1, 3:1, 3.1:1, 3.2:1, 3.3:1, 3.4:1, 3.5:1, 3.6:1, 3.7:1, 3.8:1, 3.9:1, 4:1, 4.1:1, 4.2:1, 4.3:1, 4.4:1, 4.5:1, 4.6:1, 4.7:1, 4.8:1, 4.9:1, 5:1, 5.1:1, 5.2:1, 5.3:1, 5.4:1, 5.5:1, 5.6:1, 5.7:1, 5.8:1, 5.9:1, 6:1, 6.1:1, 6.2:1, 6.3:1, 6.4:1, 6.5:1, 6.6:1, 6.7:1, 6.8:1, 6.9:1, 7:1, 7.1:1, 7.2:1, 7.3:1, 7.4:1, 7.5:1, 7.6:1, 7.7:1, 7.8:1, 7.9:1, 8:1, 8.1:1, 8.2:1, 8.3:1, 8.4:1, 8.5:1, 8.6:1, 8.7:1, 8.8:1, 8.9:1, 9:1, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 9.8:1, 9.9:1, 10:1, 1:0.9, 1:0.8, 1:0.7, 1:0.6, 1:0.5, 1:0.4, 1:0.3, 1:0.2, 1:0.1.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una proporción de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 (p/p) de aproximadamente 1:1:1 a aproximadamente 1:10:1.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una proporción de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 que se expresa en microgramos (μ g).

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV, el ARNm del hMPV y el ARNm del hPIV3 están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente un microgramo de ARNm del hRSV a aproximadamente un microgramo de ARNm del hMPV a aproximadamente un microgramo de ARNm del hPIV3.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV, el ARNm del hMPV y el ARNm del hPIV3 están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente un microgramo de ARNm del hRSV a

aproximadamente dos microgramos de ARNm del hMPV a aproximadamente un microgramo de ARNm del hPIV3.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV, el ARNm del hMPV y el ARNm del hPIV3 están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1 microgramo de ARNm del hRSV a aproximadamente 3 microgramos de ARNm del hMPV a aproximadamente 1 microgramo de ARNm del hPIV3.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV, el ARNm del hMPV y el ARNm del hPIV3 están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente un microgramo de ARNm del hRSV a aproximadamente cinco microgramos de ARNm del hMPV a aproximadamente un microgramo de ARNm del hPIV3.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV, el ARNm del hMPV y el ARNm del hPIV3 están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 0.5 microgramos de ARNm del hRSV a aproximadamente 0.5 microgramos de ARNm del hMPV a aproximadamente 0.1 microgramos de ARNm del hPIV3.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV, el ARNm del hMPV y el ARNm del hPIV3 están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 0.5 microgramos de ARNm del hRSV a aproximadamente 0.5 microgramos de ARNm del hMPV a aproximadamente 0.5 microgramos de ARNm del hPIV3.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV, el ARNm del hMPV y el ARNm del hPIV3 están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 0.5 microgramo de ARNm del hRSV a aproximadamente 1.5 microgramos de ARNm del hMPV a aproximadamente 0.5 microgramo de ARNm del hPIV3.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV, el ARNm del hMPV y el ARNm del hPIV3 están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 0.5 microgramos de ARNm del hRSV a aproximadamente 1 microgramo de ARNm del hMPV a aproximadamente 0.5 microgramos de ARNm del hPIV3.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV, el ARNm del hMPV y el ARNm del hPIV3 están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 0.5 microgramo de ARNm del hRSV a aproximadamente 2.5 microgramos de ARNm del hMPV a aproximadamente 0.5 microgramo de ARNm del hPIV3.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV, el ARNm del hMPV y el ARNm del hPIV3 están presentes en una proporción (p/p) de 1 microgramo de ARNm del hRSV a 1 microgramo de ARNm del hMPV a 1 microgramo de ARNm del hPIV3.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV, el ARNm del hMPV y el ARNm del hPIV3 están presentes en una proporción (p/p) de 1 microgramo de ARNm del hRSV a 2 microgramos de ARNm del hMPV a 1 microgramo de ARNm del hPIV3.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV, el ARNm del hMPV y el ARNm del hPIV3 están presentes en una proporción (p/p) de 1 microgramo de ARNm del hRSV a 3 microgramos de ARNm del hMPV a 1 microgramo de ARNm del hPIV3.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV, el ARNm del hMPV y el ARNm del hPIV3 están presentes en una proporción (p/p) de 1 microgramo de ARNm del hRSV a 5 microgramos de ARNm del hMPV a 1 microgramo de ARNm del hPIV3.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV, el ARNm del hMPV y el ARNm del hPIV3 están presentes en una proporción (p/p) de 0.5 microgramos de ARNm del hRSV a 0.5 microgramos de ARNm del hMPV a 0.1 microgramos de ARNm del hPIV3.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV, el ARNm del hMPV y el ARNm del hPIV3 están presentes en una proporción (p/p) de 0.5 microgramos de ARNm del hRSV a 0.5 microgramos de ARNm del hMPV a 0.5 microgramos de ARNm del hPIV3.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV, el ARNm del hMPV y el ARNm del hPIV3 están presentes en

una proporción (p/p) de 0.5 microgramo de ARNm del hRSV a 1.5 microgramos de ARNm del hMPV a 0.5 microgramo de ARNm del hPIV3.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV, el ARNm del hMPV y el ARNm del hPIV3 están presentes en una proporción (p/p) de 0.5 microgramos de ARNm del hRSV a 1 microgramo de ARNm del hMPV a 0.5 microgramos de ARNm del hPIV3.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV, el ARNm del hMPV y el ARNm del hPIV3 están presentes en una proporción (p/p) de 0.5 microgramo de ARNm del hRSV a 2.5 microgramos de ARNm del hMPV a 0.5 microgramo de ARNm del hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una proporción de ARNm de hRSV:hMPV (p/p) de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:10.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una proporción de ARNm de hRSV:hMPV que se expresa en microgramos (μ g).

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV y el ARNm del hMPV están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1 microgramo de ARNm del hRSV a aproximadamente 1 microgramo de ARNm del hMPV.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV y el ARNm del hMPV están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1 microgramo de ARNm del hRSV a aproximadamente 2 microgramos de ARNm del hMPV.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV y el ARNm del hMPV están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1 microgramo de ARNm del hRSV a aproximadamente 3 microgramos de ARNm del hMPV.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV y el ARNm del hMPV están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 1 microgramo de ARNm del hRSV a aproximadamente 5 microgramos de ARNm del hMPV.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV y el ARNm del hMPV están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 0.5 microgramo de ARNm del hRSV a aproximadamente 0.5 microgramo de ARNm del hMPV.

- 5 La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV y el ARNm del hMPV están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 0.5 microgramos de ARNm del hRSV a aproximadamente 1.5 microgramos de ARNm del hMPV.

- 10 La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV y el ARNm del hMPV están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 0.5 microgramos de ARNm del hRSV a aproximadamente 1 microgramos de ARNm del hMPV.

- 15 La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV y el ARNm del hMPV están presentes en una proporción (p/p) de aproximadamente 0.5 microgramo de ARNm del hRSV a aproximadamente 2.5 microgramos de ARNm del hMPV.

- 20 La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV y el ARNm del hMPV están presentes en una proporción (p/p) de 1 microgramo de ARNm del hRSV a 1 microgramo de ARNm del hMPV.

- 20 La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV y el ARNm del hMPV están presentes en una proporción (p/p) de 1 microgramo de ARNm del hRSV a 2 microgramos de ARNm del hMPV.

- 25 La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV y el ARNm del hMPV están presentes en una proporción (p/p) de 1 microgramo de ARNm del hRSV a 3 microgramos de ARNm del hMPV.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV y el ARNm del hMPV están presentes en una proporción (p/p) de 1 microgramo de ARNm del hRSV a 5 microgramos de ARNm del hMPV.

- 30 La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV y el ARNm del hMPV están presentes en una proporción (p/p) de 0.5 microgramo de ARNm del hRSV a 0.5 microgramo de ARNm del hMPV.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV y el ARNm del hMPV están presentes en una proporción (p/p) de 0.5 microgramos de ARNm del hRSV a 1.5 microgramos de ARNm del hMPV.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el
5 ARNm del hRSV y el ARNm del hMPV están presentes en una proporción (p/p) de 0.5 microgramos de ARNm del hRSV a 1 microgramos de ARNm del hMPV.

La composición en cualquiera de las realizaciones anteriores en donde el ARNm del hRSV y el ARNm del hMPV están presentes en una proporción (p/p) de 0.5 microgramos de ARNm del hRSV a 2.5 microgramos de ARNm del hMPV.

10 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una proporción de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 (por ejemplo, μg) de aproximadamente 1:1:1, 1:1.1:1, 1:1.2:1, 1:1.3:1, 1:1.4:1, 1:1.5:1, 1:1.6:1, 1:1.7:1, 1:1.8:1, 1:1.9:1, 1:2:1, 1:2.1:1, 1:2.2:1, 1:2.3:1, 1:2.4:1, 1:2.5:1, 1:2.6:1, 1:2.7:1, 1:2.8:1, 1:2.9:1, 1:3:1, 1:3.1:1, 1:3.2:1, 1:3.3:1, 1:3.4:1, 1:3.5:1, 1:3.6:1,
15 1:3.7:1, 1:3.8:1, 1:3.9:1, 1:4:1, 1:4.1:1, 1:4.2:1, 1:4.3:1, 1:4.4:1, 1:4.5:1, 1:4.6:1, 1:4.7:1, 1:4.8:1, 1:4.9:1, 1:5:1, 1:5.1:1, 1:5.2:1, 1:5.3:1, 1:5.4:1, 1:5.5:1, 1:5.6:1, 1:5.7:1, 1:5.8:1, 1:5.9:1, 1:6:1, 1:6.1:1, 1:6.2:1, 1:6.3:1, 1:6.4:1, 1:6.5:1, 1:6.6:1, 1:6.7:1, 1:6.8:1, 1:6.9:1, 1:7:1, 1:7.1:1, 1:7.2:1, 1:7.3:1, 1:7.4:1, 1:7.5:1, 1:7.6:1, 1:7.7:1, 1:7.8:1, 1:7.9:1, 1:8:1, 1:8.1:1, 1:8.2:1, 1:8.3:1, 1:8.4:1, 1:8.5:1, 1:8.6:1,
20 1:8.7:1, 1:8.8:1, 1:8.9:1, 1:9:1, 1:9.1:1, 1:9.2:1, 1:9.3:1, 1:9.4:1, 1:9.5:1, 1:9.6:1, 1:9.7:1, 1:9.8:1, 1:9.9:1, 1:10:1, 1:1:0.9, 1:1:0.8, 1:1:0.7, 1:1:0.6, 1:1:0.5, 1:1:0.4, 1:1:0.3, 1:1:0.2, 1:1:0.1.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una proporción de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 (por ejemplo, μg)
25 de 1:1:1, 1:1.1:1, 1:1.2:1, 1:1.3:1, 1:1.4:1, 1:1.5:1, 1:1.6:1, 1:1.7:1, 1:1.8:1, 1:1.9:1, 1:2:1, 1:2.1:1, 1:2.2:1, 1:2.3:1, 1:2.4:1, 1:2.5:1, 1:2.6:1, 1:2.7:1, 1:2.8:1, 1:2.9:1, 1:3:1, 1:3.1:1, 1:3.2:1, 1:3.3:1, 1:3.4:1, 1:3.5:1, 1:3.6:1, 1:3.7:1, 1:3.8:1, 1:3.9:1, 1:4:1, 1:4.1:1, 1:4.2:1, 1:4.3:1, 1:4.4:1, 1:4.5:1, 1:4.6:1, 1:4.7:1, 1:4.8:1, 1:4.9:1, 1:5:1, 1:5.1:1, 1:5.2:1, 1:5.3:1, 1:5.4:1, 1:5.5:1, 1:5.6:1, 1:5.7:1, 1:5.8:1,
30 1:5.9:1, 1:6:1, 1:6.1:1, 1:6.2:1, 1:6.3:1, 1:6.4:1, 1:6.5:1, 1:6.6:1, 1:6.7:1, 1:6.8:1, 1:6.9:1, 1:7:1, 1:7.1:1, 1:7.2:1, 1:7.3:1, 1:7.4:1, 1:7.5:1, 1:7.6:1, 1:7.7:1, 1:7.8:1, 1:7.9:1, 1:8:1, 1:8.1:1, 1:8.2:1, 1:8.3:1, 1:8.4:1, 1:8.5:1, 1:8.6:1, 1:8.7:1, 1:8.8:1,

1:8.9:1, 1:9:1, 1:9.1:1, 1:9.2:1, 1:9.3:1, 1:9.4:1, 1:9.5:1, 1:9.6:1, 1:9.7:1, 1:9.8:1, 1:9.9:1, 1:10:1, 1:1:0.9, 1:1:0.8, 1:1:0.7, 1:1:0.6, 1:1:0.5, 1:1:0.4, 1:1:0.3, 1:1:0.2, 1:1:0.1.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden
5 comprender una proporción de ARNm de hRSV:hMPV (por ejemplo, µg) de
aproximadamente 1:1, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9,
1:2, 1:2.1, 1:2.2, 1:2.3, 1:2.4, 1:2.5, 1:2.6, 1:2.7, 1:2.8, 1:2.9, 1:3, 1:3.1, 1:3.2,
1:3.3, 1:3.4, 1:3.5, 1:3.6, 1:3.7, 1:3.8, 1:3.9, 1:4, 1:4.1, 1:4.2, 1:4.3, 1:4.4, 1:4.5,
1:4.6, 1:4.7, 1:4.8, 1:4.9, 1:5, 1:5.1, 1:5.2, 1:5.3, 1:5.4, 1:5.5, 1:5.6, 1:5.7, 1:5.8,
10 1:5.9, 1:6, 1:6.1, 1:6.2, 1:6.3, 1:6.4, 1:6.5, 1:6.6, 1:6.7, 1:6.8, 1:6.9, 1:7, 1:7.1,
1:7.2, 1:7.3, 1:7.4, 1:7.5, 1:7.6, 1:7.7, 1:7.8, 1:7.9, 1:8, 1:8.1, 1:8.2, 1:8.3, 1:8.4,
1:8.5, 1:8.6, 1:8.7, 1:8.8, 1:8.9, 1:9, 1:9.1, 1:9.2, 1:9.3, 1:9.4, 1:9.5, 1:9.6, 1:9.7,
1:9.8, 1:9.9, 1:10.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden
15 comprender una proporción de ARNm de hRSV:hMPV (por ejemplo, µg) de 1:1,
1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9, 1:2, 1:2.1, 1:2.2, 1:2.3,
1:2.4, 1:2.5, 1:2.6, 1:2.7, 1:2.8, 1:2.9, 1:3, 1:3.1, 1:3.2, 1:3.3, 1:3.4, 1:3.5, 1:3.6,
1:3.7, 1:3.8, 1:3.9, 1:4, 1:4.1, 1:4.2, 1:4.3, 1:4.4, 1:4.5, 1:4.6, 1:4.7, 1:4.8, 1:4.9,
1:5, 1:5.1, 1:5.2, 1:5.3, 1:5.4, 1:5.5, 1:5.6, 1:5.7, 1:5.8, 1:5.9, 1:6, 1:6.1, 1:6.2,
20 1:6.3, 1:6.4, 1:6.5, 1:6.6, 1:6.7, 1:6.8, 1:6.9, 1:7, 1:7.1, 1:7.2, 1:7.3, 1:7.4, 1:7.5,
1:7.6, 1:7.7, 1:7.8, 1:7.9, 1:8, 1:8.1, 1:8.2, 1:8.3, 1:8.4, 1:8.5, 1:8.6, 1:8.7, 1:8.8,
1:8.9, 1:9, 1:9.1, 1:9.2, 1:9.3, 1:9.4, 1:9.5, 1:9.6, 1:9.7, 1:9.8, 1:9.9, 1:10.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden
comprender una proporción de ARNm de hMPV:hPIV3 (por ejemplo, µg) de
25 aproximadamente 1:1, 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1, 1.6:1, 1.7:1, 1.8:1, 1.9:1,
2:1, 2.1:1, 2.2:1, 2.3:1, 2.4:1, 2.5:1, 2.6:1, 2.7:1, 2.8:1, 2.9:1, 3:1, 3.1:1, 3.2:1,
3.3:1, 3.4:1, 3.5:1, 3.6:1, 3.7:1, 3.8:1, 3.9:1, 4:1, 4.1:1, 4.2:1, 4.3:1, 4.4:1, 4.5:1,
4.6:1, 4.7:1, 4.8:1, 4.9:1, 5:1, 5.1:1, 5.2:1, 5.3:1, 5.4:1, 5.5:1, 5.6:1, 5.7:1, 5.8:1,
5.9:1, 6:1, 6.1:1, 6.2:1, 6.3:1, 6.4:1, 6.5:1, 6.6:1, 6.7:1, 6.8:1, 6.9:1, 7:1, 7.1:1,
30 7.2:1, 7.3:1, 7.4:1, 7.5:1, 7.6:1, 7.7:1, 7.8:1, 7.9:1, 8:1, 8.1:1, 8.2:1, 8.3:1, 8.4:1,
8.5:1, 8.6:1, 8.7:1, 8.8:1, 8.9:1, 9:1, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1,
9.8:1, 9.9:1, 10:1, 1:0.9, 1:0.8, 1:0.7, 1:0.6, 1:0.5, 1:0.4, 1:0.3, 1:0.2, 1:0.1.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una proporción de ARNm de hMPV:hPIV3 (por ejemplo, μg) de 1:1, 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1, 1.6:1, 1.7:1, 1.8:1, 1.9:1, 2:1, 2.1:1, 2.2:1, 2.3:1, 2.4:1, 2.5:1, 2.6:1, 2.7:1, 2.8:1, 2.9:1, 3:1, 3.1:1, 3.2:1, 3.3:1, 3.4:1, 3.5:1, 3.6:1, 3.7:1, 3.8:1, 3.9:1, 4:1, 4.1:1, 4.2:1, 4.3:1, 4.4:1, 4.5:1, 4.6:1, 4.7:1, 4.8:1, 4.9:1, 5:1, 5.1:1, 5.2:1, 5.3:1, 5.4:1, 5.5:1, 5.6:1, 5.7:1, 5.8:1, 5.9:1, 6:1, 6.1:1, 6.2:1, 6.3:1, 6.4:1, 6.5:1, 6.6:1, 6.7:1, 6.8:1, 6.9:1, 7:1, 7.1:1, 7.2:1, 7.3:1, 7.4:1, 7.5:1, 7.6:1, 7.7:1, 7.8:1, 7.9:1, 8:1, 8.1:1, 8.2:1, 8.3:1, 8.4:1, 8.5:1, 8.6:1, 8.7:1, 8.8:1, 8.9:1, 9:1, 9.1:1, 9.2:1, 9.3:1, 9.4:1, 9.5:1, 9.6:1, 9.7:1, 9.8:1, 9.9:1, 10:1, 1:0.9, 1:0.8, 1:0.7, 1:0.6, 1:0.5, 1:0.4, 1:0.3, 1:0.2, 1:0.1.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender una proporción expresada, por ejemplo, en picogramos (pg), nanogramos (ng), microgramos (μg), miligramos (mg), etc.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 1 vez, o aproximadamente 1 vez, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 1.1 veces, o aproximadamente 1.1 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 1.2 veces, o aproximadamente 1.2 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 1.3 veces, o aproximadamente 1.3 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 1.4 veces, o aproximadamente 1.4 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 1.5 veces, o aproximadamente 1.5 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 1.6 veces, o aproximadamente 1.6 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

5 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 1.7 veces, o aproximadamente 1.7 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 1.8 veces, o aproximadamente 1.8 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

10 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 1.9 veces, o aproximadamente 1.9 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 2 veces, o aproximadamente 2 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

15 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 2.1 veces, o aproximadamente 2.1 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

20 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 2.2 veces, o aproximadamente 2.2 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 2.3 veces, o aproximadamente 2.3 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

25 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 2.4 veces, o aproximadamente 2.4 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 2.5 veces, o aproximadamente 2.5 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

30

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 2.6 veces, o aproximadamente 2.6 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

5 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 2.7 veces, o aproximadamente 2.7 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 2.8 veces, o aproximadamente 2.8 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

10 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 2.9 veces, o aproximadamente 2.9 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 3 veces, o aproximadamente 3 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

15 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 3.1 veces, o aproximadamente 3.1 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 3.2 veces, o aproximadamente 3.2 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

20 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 3.3 veces, o aproximadamente 3.3 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

25 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 3.4 veces, o aproximadamente 3.4 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 3.5 veces, o aproximadamente 3.5 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

30

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 3.6 veces, o aproximadamente 3.6 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

5 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 3.7 veces, o aproximadamente 3.7 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 3.8 veces, o aproximadamente 3.8 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

10 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 3.9 veces, o aproximadamente 3.9 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 4 veces, o aproximadamente 4 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

15 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 4.1 veces, o aproximadamente 4.1 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

20 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 4.2 veces, o aproximadamente 4.2 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 4.3 veces, o aproximadamente 4.3 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

25 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 4.4 veces, o aproximadamente 4.4 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

30 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 4.5 veces, o aproximadamente 4.5 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 4.6 veces, o aproximadamente 4.6 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

5 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 4.7 veces, o aproximadamente 4.7 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 4.8 veces, o aproximadamente 4.8 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

10 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 4.9 veces, o aproximadamente 4.9 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 5 veces, o aproximadamente 5 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

15 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 5.1 veces, o aproximadamente 5.1 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 5.2 veces, o aproximadamente 5.2 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

20 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 5.3 veces, o aproximadamente 5.3 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

25 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 5.4 veces, o aproximadamente 5.4 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 5.5 veces, o aproximadamente 5.5 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

30

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 5.6 veces, o aproximadamente 5.6 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

5 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 5.7 veces, o aproximadamente 5.7 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 5.8 veces, o aproximadamente 5.8 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

10 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 5.9 veces, o aproximadamente 5.9 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 6 veces, o aproximadamente 6 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

15 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 6.1 veces, o aproximadamente 6.1 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

20 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 6.2 veces, o aproximadamente 6.2 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 6.3 veces, o aproximadamente 6.3 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

25 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 6.4 veces, o aproximadamente 6.4 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 6.5 veces, o aproximadamente 6.5 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

30

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 6.6 veces, o aproximadamente 6.6 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

5 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 6.7 veces, o aproximadamente 6.7 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 6.8 veces, o aproximadamente 6.8 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

10 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 6.9 veces, o aproximadamente 6.9 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 7 veces, o aproximadamente 7 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

15 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 7.1 veces, o aproximadamente 7.1 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 7.2 veces, o aproximadamente 7.2 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

20 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 7.3 veces, o aproximadamente 7.3 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

25 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 7.4 veces, o aproximadamente 7.4 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 7.5 veces, o aproximadamente 7.5 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

30

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 7.6 veces, o aproximadamente 7.6 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

5 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 7.7 veces, o aproximadamente 7.7 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 7.8 veces, o aproximadamente 7.8 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

10 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 7.9 veces, o aproximadamente 7.9 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 8 veces, o aproximadamente 8 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

15 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 8.1 veces, o aproximadamente 8.1 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

20 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 8.2 veces, o aproximadamente 8.2 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 8.3 veces, o aproximadamente 8.3 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

25 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 8.4 veces, o aproximadamente 8.4 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 8.5 veces, o aproximadamente 8.5 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

30

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 8.6 veces, o aproximadamente 8.6 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

5 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 8.7 veces, o aproximadamente 8.7 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 8.8 veces, o aproximadamente 8.8 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

10 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 8.9 veces, o aproximadamente 8.9 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 9 veces, o aproximadamente 9 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

15 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 9.1 veces, o aproximadamente 9.1 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

20 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 9.2 veces, o aproximadamente 9.2 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 9.3 veces, o aproximadamente 9.3 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

25 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 9.4 veces, o aproximadamente 9.4 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

30 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 9.5 veces, o aproximadamente 9.5 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 9.6 veces, o aproximadamente 9.6 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

5 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 9.7 veces, o aproximadamente 9.7 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 9.8 veces, o aproximadamente 9.8 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

10 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 9.9 veces, o aproximadamente 9.9 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hMPV en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 10 veces, o aproximadamente 10 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hPIV3.

15 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hPIV3 en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 0.9 veces, o aproximadamente 0.9 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hMPV.

20 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hPIV3 en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 0.8 veces, o aproximadamente 0.8 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hMPV.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hPIV3 en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 0.7 veces, o aproximadamente 0.7 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hMPV.

25 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hPIV3 en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 0.6 veces, o aproximadamente 0.6 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hMPV.

30 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hPIV3 en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 0.5 veces, o aproximadamente 0.5 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hMPV.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hPIV3 en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 0.4 veces, o aproximadamente 0.4 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hMPV.

5 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hPIV3 en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 0.3 veces, o aproximadamente 0.3 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hMPV.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hPIV3 en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 0.2 veces, o aproximadamente 0.2 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hMPV.

10 Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender ARNm de hPIV3 en una cantidad (por ejemplo, μg) que es 0.1 veces, o aproximadamente 0.1 veces, la cantidad de ARNm de hRSV y/o hMPV.

Las composiciones en cualquiera de las realizaciones anteriores pueden comprender cantidades de ARNm expresadas, por ejemplo, en picogramos (pg),
15 nanogramos (ng), microgramos (μg), miligramos (mg), etc.

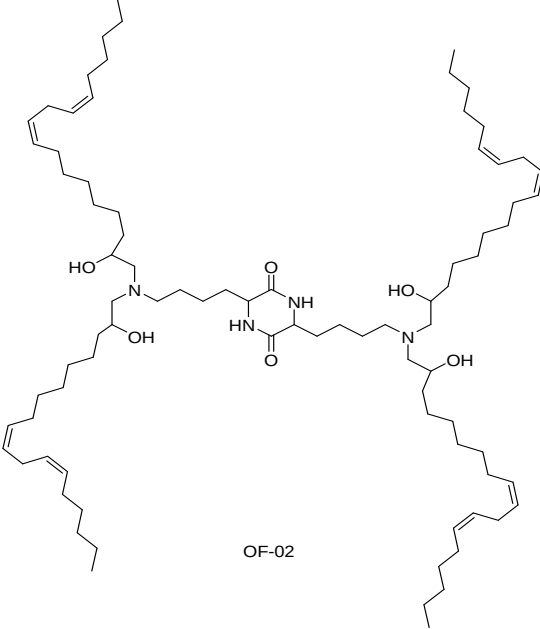
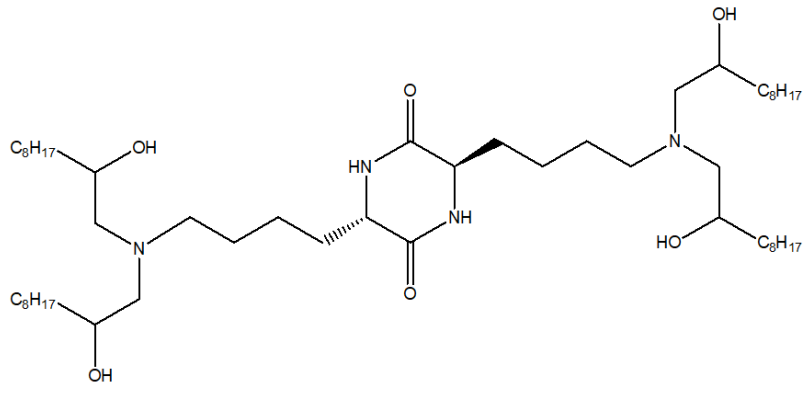
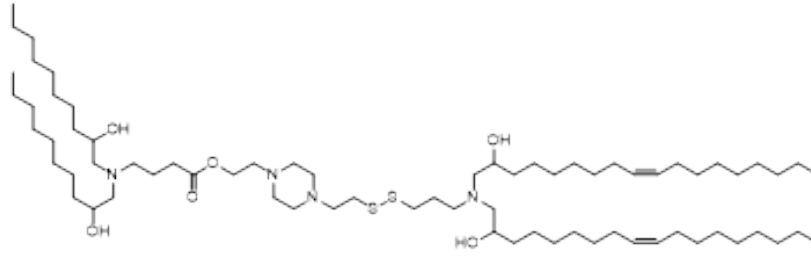
VII. Nanopartícula lipídica (LNP)

Las LNP de la divulgación pueden comprender cuatro categorías de lípidos: (i) un lípido ionizable (por ejemplo, lípido catiónico); (ii) un lípido PEGilado; (iii) un lípido basado en colesterol (por ejemplo, colesterol) y (iv) un
20 lípido auxiliar.

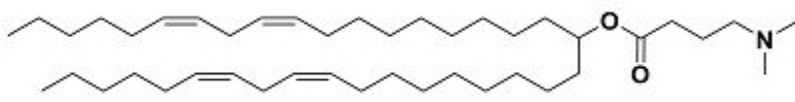
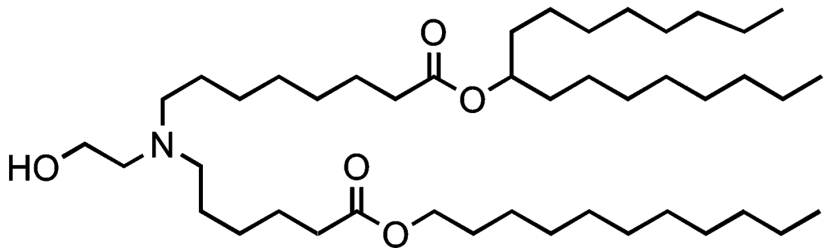
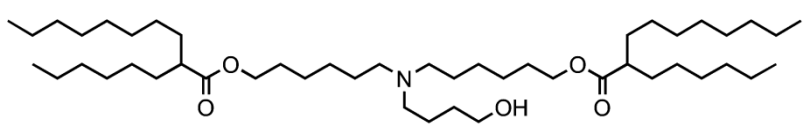
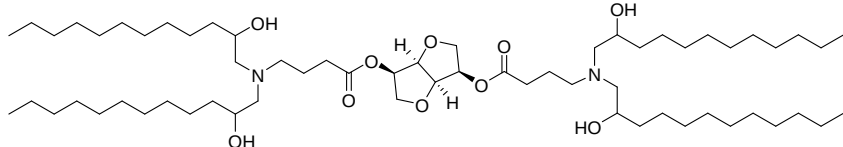
VII.A. Lípido catiónico

Un lípido ionizable facilita la encapsulación del ARNm y puede ser un lípido catiónico. Un lípido catiónico proporciona un entorno cargado positivamente a un pH bajo para facilitar la encapsulación eficaz de la sustancia
25 farmacéutica de ARNm cargada negativamente. A continuación, se muestran lípidos catiónicos ilustrativos en la **tabla 1**.

Tabla 1 – Lípidos ionizables

Nombre	Estructura
OF-02 (ML7)	 OF-02
cKK-E10	 cKK-E10
GL-HEPES-E3- E10-DS-3-E18- 1 ((2-(4-(2-((3- (Bis((Z)-2- hydroxyoctadec-	 GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1

5	9-en-1-yl)amino)propyl)disulfaneyl)ethyl)piperazin-1-yl)ethyl 4-(bis(2-hydroxydecyl)amino)butanoate)	
10	GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 (2-(4-(2-((3-(bis(2-hydroxydecyl)amino)butyl)disulfaneyl)ethyl)piperazin-1-yl)ethyl 4-(bis(2-hydroxydodecyl)amino)butanoate)	
25	GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 (2-(4-(2-((3-(Bis(2-hydroxytetradecyl)amino)propyl)disulfaneyl)ethyl)piperazin-1-yl)ethyl 4-(bis(2-hydroxydodecyl)	

	amino)butanoate)	
5	MC3	
10	SM-102 (9-heptadecanyl 8-[(2-hydroxyethyl)[6-oxo-6-(undecyloxy)hexyl]amino]octanoate)	
15	ALC-0315 [(4-hydroxybutyl)azanediyl]di(hexano-6,1-diyl) bis(2-hexyldecanoate)	
20	IM-001	

25 El lípido catiónico puede seleccionarse del grupo que comprende 4-(dimetilamino)butanoato de [ckkE10] / [OF-02], [(6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il] (D-Lin-MC3-DMA); 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (DLin-KC2-DMA); 1,2-dilinoleiloxi-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-(undeciloxy)hexil]amino]octanoato de 9-heptadecanilo (SM-102); bis(2-hexildecanoato) de [(4-hidroxibutil)azanediil]di(hexano-6,1-diilo) (ALC-0315); (Z)-octadec-9-enoato de [3-(dimetilamino)-2-[(Z)-octadec-9-enoil]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-Chol); bis(propano-3,1 diil))bis (azanetriil))tetrapropionato de tetrakis(8-metilnonil) 3,3',3'',3'''-(((metilazanedil) (306Oi10); phosphato de decil (2-(diocetilammonio)etil) (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-ditiia-3,6-diazahexacosil)azanedil)dipropionato de bis(2-(dodecildisulfanil)etilo) (BAME-O16B); 1,1'-((2-(4-(2-((2-(bis(2-hidroxidodecil)amino)etil) (2-hidroxododecol)amino)etil) piperazin-1-il)etil)azanedil) bis(dodecan-2-ol) (C12-200); 3,6-bis(4-(bis(2-hidroxidodecil)amino)butil)piperazin-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-dioxopiperazina-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-hidroxi)etil)(8-(noniloxi)-8-oxooctil)amino)octanoato de heptadecan-9-ilo (Lipid 5); IM-001 y combinaciones de los mismos.

En determinadas realizaciones, el lípido catiónico es biodegradable.

En varias realizaciones, el lípido catiónico no es biodegradable.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico es escindible.

En determinadas realizaciones, el lípido catiónico no es escindible.

Los lípidos catiónicos se describen con más detalle en Dong *et al.* (PNAS. 111(11):3955-60. 2014); Fenton *et al.* (Adv. Mater. 28:2939. 2016); la patente de EE. UU. n.º 9,512,073 y la patente de EE. UU. n.º 10,201,618, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia.

30 VII.B. Lípido PEGilado

El componente lipídico PEGilado proporciona control sobre el tamaño de las partículas y la estabilidad de la nanopartícula. La adición de dichos

componentes puede prevenir la agregación compleja y proporcionar un medio para aumentar la vida útil en circulación y aumentar la administración de la composición farmacéutica de lípidos y ácidos nucleicos a los tejidos diana (Klibanov *et al.* FEBS Letters 268(1):235-7. 1990). Estos componentes pueden seleccionarse para intercambiarse rápidamente fuera de la composición farmacéutica *in vivo* (véase, p. ej., la patente de EE. UU. n.º 5,885,613).

Los lípidos PEGilados contemplados incluyen, pero no se limitan a, una cadena de polietilenglicol (PEG) de hasta 5 kDa de longitud unida covalentemente a un lípido con cadena(s) alquílica(s) 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)] (ceramida C8-PEG)). En algunas realizaciones, el lípido PEGilado es 1,2-dimiristoil-*rac*-glicero-3-metoxipolietilenglicol (DMG-PEG); 1,2-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-dialquioxipropilcarbamato; 2-[(polietilenglicol)-2000]-*N,N*-ditetradecilacetamida (ALC-0159); y combinaciones de estos.

En determinadas realizaciones, el PEG tiene un peso molecular elevado, por ejemplo, de 2000 a 2400 g/mol. En determinadas realizaciones, el PEG es PEG2000 (o PEG-2K). En determinadas realizaciones, el lípido PEGilado en el presente documento es DMG-PEG2000, DSPE-PEG2000, DLPE-PEG2000, DSG-PEG2000, C8 PEG2000 o ALC-0159 (2-[(polietilenglicol)-2000]-*N,N*-ditetradecilacetamida). En determinadas realizaciones, el lípido PEGilado en el presente documento es DMG-PEG2000.

VII.C. Lípidos basados en colesterol

El componente de colesterol proporciona estabilidad a la estructura de la bicapa lipídica en 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; la patente de EE. UU. 5,744,335), éster de colesterol imidazólico ("ICE"; publicación internacional n.º WO 2011/068810), sitosterol (22,23-dihidroestigmasterol), β -sitosterol, sitostanol, fucosterol, estigmasterol (estigmasterol-5,22-dien-3-ol), ergosterol; desmosterol (3 β -hidroxi-5,24-colestadieno); lanosterol (8,24-lanostadien-3 β -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 ((3 β ,25R)-espirost-5-en-3-ol); campesterol (campest-5-en-3 β -ol); campestanol (5 α -campestan-3 β -ol); 24-metilenocolesterol (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 colesterol.

VII.D. Lípido auxiliar

Un lípido auxiliar mejora la estabilidad estructural de la LNP y ayuda a la LNP a escapar del endosoma. Mejora la captación y la liberación de la carga farmacológica de ARNm. En algunas realizaciones, el lípido auxiliar es un lípido dipolar, que tiene propiedades fusogénicas para aumentar la captación y la liberación de la carga farmacológica. Son ejemplos de lípidos auxiliares 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-diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) y 1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DLPE).

Otros lípidos auxiliares ilustrativos son dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), dioleoilfosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-l-carboxilato (DOPE-mal), dipalmitoil fosfatidiletanolamina (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 determinadas realizaciones, el lípido auxiliar es DOPE. En determinadas realizaciones, el lípido auxiliar es DSPC.

En diversas realizaciones, las presentes LNP comprenden (i) un lípido catiónico seleccionado de 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.

VII.E. Proporciones molares de los componentes lipídicos

Las proporciones molares de los componentes anteriores son importantes para la eficacia de las LNP en el suministro de ARNm. La proporción 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 proporción molar del lípido catiónico en las LNP con respecto a los lípidos totales (es decir, A) es del 35 al 55 %, tal como del 35 al 50 % (por ejemplo, del 38 al 42 %, tal como el 40 %, o del 45 al 50 %). En algunas realizaciones, la proporción molar del componente lipídico PEGilado con respecto a los lípidos totales (es decir, B) es del 0.25 al 2.75 % (por ejemplo, del 1 al 2 %, tal como el 1.5 %). En algunas realizaciones, la proporción molar del lípido basado en colesterol con respecto a los lípidos totales (es decir, C) es del 20 al 50 % (por ejemplo, del 27 al 30 %, tal como el 28.5 % o del 38 al 43 %). En algunas realizaciones, la proporción molar del lípido auxiliar con respecto a los lípidos totales (es decir, D) es del 5 al 35 % (por ejemplo, del 28 al 32 %, tal como el 30 % o del 8 al 12 %, tal como el 10 %). En algunas realizaciones, los componentes (lípido PEGilado + colesterol) tienen la misma cantidad molar que el lípido auxiliar. En algunas realizaciones, las LNP contienen una proporción molar del lípido catiónico al lípido auxiliar que es superior a 1.

En determinadas realizaciones, el LNP de la divulgación comprende:

un lípido catiónico en una proporción molar del 35 % al 55 % o del 40 % al 50 % (p. ej., un lípido catiónico en una proporción molar del 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) en una proporción molar del 0.25 % al 2.75 % o del 1.00 % al 2.00 % (p. ej., un lípido PEGilado en una proporción molar del 0.25 %, 0.50 %, 0.75 %, 1.00 %, 1.25 %, 1.50 %, 1.75 %, 2.00 %, 2.25 %, 2.50 % o 2.75 %);

5 un lípido basado en colesterol en una proporción molar del 20 % al 50 %, del 25 % al 45 % o del 28.5 % al 43 % (p. ej., un lípido basado en colesterol en una proporción molar del 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

10 un lípido auxiliar en una proporción molar del 5 % al 35 %, del 8 % al 30 % o del 10 % al 30 % (p. ej., un lípido auxiliar en una proporción molar del 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 %),

15 en donde todas las proporciones molares son respecto al contenido total de lípidos de la LNP.

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: un lípido catiónico en una proporción molar del 40 %; un lípido PEGilado en una proporción molar del 1.5 %; un lípido basado en colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y un

20 lípido auxiliar en una proporción molar del 30 %.

En determinadas realizaciones, el lípido PEGilado es dimiristol-PEG2000 (DMG-PEG2000).

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

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

25 fosfoetanolamina (DOPE).

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: OF-02 en una proporción molar del 35 % al 55 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 0.25 % al 2.75 %; colesterol en una proporción molar del 20 % al 50 %; y DOPE en una proporción molar del 5 % al 35 %.

30 En determinadas realizaciones, la LNP comprende: cKK-E10 en una proporción molar del 35 % al 55 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del

0.25 % al 2.75 %; colesterol en una proporción molar del 20 % al 50 %; y DOPE en una proporción molar del 5 % al 35 %.

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1 en una proporción molar del 35 % al 55 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 0.25 % al 2.75 %; colesterol en una proporción molar del 20 % al 50 %; y DOPE en una proporción molar del 5 % al 35 %.

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 en una proporción molar del 35 % al 55 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 0.25 % al 2.75 %; colesterol en una proporción molar del 20 % al 50 %; y DOPE en una proporción molar del 5 % al 35 %.

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 en una proporción molar del 35 % al 55 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 0.25 % al 2.75 %; colesterol en una proporción molar del 20 % al 50 %; y DOPE en una proporción molar del 5 % al 35 %.

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: SM-102 en una proporción molar del 35 % al 55 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 0.25 % al 2.75 %; colesterol en una proporción molar del 20 % al 50 %; y DSPC en una proporción molar del 5 % al 35 %.

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: ALC-0315 en una proporción molar del 35 % al 55 %; ALC-0159 en una proporción molar del 0.25 % al 2.75 %; colesterol en una proporción molar del 20 % al 50 %; y DSPC en una proporción molar del 5 % al 35 %.

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: OF-02 en una proporción molar del 40 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %; colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y DOPE en una proporción molar del 30 %. En el presente documento, esta formulación de LNP se denomina "Lípido A".

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: cKK-E10 en una proporción molar del 40 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %; colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y DOPE en una proporción molar del 30 %. En el presente documento esta formulación de LNP se denomina "Lípido B".

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: GL-HEPES-E3-E10-DS-3-E18-1 en una proporción molar del 40 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %; colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y DOPE en una proporción molar del 30 %. En el presente documento esta
5 formulación de LNP se denomina "Lípido C".

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 en una proporción molar del 40 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %; colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y DOPE en una proporción molar del 30 %. En el presente documento esta formulación de LNP
10 se denomina "Lípido D".

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: GL-HEPES-E3-E12-DS-3-E14 en una proporción molar del 40 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %; colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y DOPE en una proporción molar del 30 %. En el presente documento esta formulación de LNP
15 se denomina "Lípido E".

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: 9-heptadecanil 8-[(2-hidroxietil)[6-oxo-6-(undeciloxi)hexil]amino]octanoato (SM-102) en una proporción molar del 50 %; 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DSPC) en una proporción molar del 10 %; colesterol en una proporción molar del 38.5 %; y
20 1,2-dimiristoil-*rac*-glicero-3-metoxipoli(etilenglicol)-2000 (DMG-PEG2000) en una proporción molar del 1.5 %.

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: (4-hidroxibutil)azanediil]di(hexano-6,1-diilo)bis(2-hexildecanoato) (ALC-0315) en una proporción molar del 46.3 %; 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DSPC)
25 en una proporción molar del 9.4 %; colesterol en una proporción molar del 42.7 %; y 2-[(poli(etilenglicol)-2000]-N,N-ditetradecilacetamida (ALC-0159) en una proporción molar del 1.6 %.

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: (4-hidroxibutil)azanediil]di(hexano-6,1-diilo)bis(2-hexildecanoato) (ALC-0315) en una proporción molar del 47.4 %; 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DSPC)
30 en una proporción molar del 10 %; colesterol en una proporción molar del 40.9 %;

y 2-[(polietilenglicol)-2000]-N,N-ditetradecilacetamida (ALC-0159) en una proporción molar del 1.7 %.

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: IM-001 en una proporción molar del 35 % al 55 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 0.25 % al 2.75 %; colesterol en una proporción molar del 20 % al 50 %; y DOPE en una proporción molar del 5 % al 35 %.

En determinadas realizaciones, la LNP comprende: IM-001 en una proporción molar del 40 %; DMG-PEG2000 en una proporción molar del 1.5 %; colesterol en una proporción molar del 28.5 %; y DOPE en una proporción molar del 30 %.

Para calcular la cantidad real de cada lípido que se colocará en una formulación de LNP, primero se determina la cantidad molar del lípido catiónico en función de la proporción 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 serán transportados por la LNP. A continuación, se calcula la cantidad molar de cada uno de los otros lípidos en función de la cantidad molar del lípido catiónico y la proporción molar seleccionada. Estas cantidades molares se convierten después en pesos usando el peso molecular de cada lípido.

VII.F. Tampón y otros componentes

Para estabilizar el ácido nucleico y/o las NPL (p. ej., para prolongar la durabilidad del producto de vacuna), para facilitar la administración de la composición farmacéutica de NPL y/o para mejorar la expresión *in vivo* del ácido nucleico, se pueden formular el ácido nucleico y/o NPL en combinación con uno o más portadores, ligandos selectivos, reactivos estabilizantes (p. ej., conservantes y antioxidantes) y/u otros excipientes farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de dichos excipientes son parabenos, timerosal, tiomersal, clorobutanol, cloruro de benzalconio y quelantes (por ejemplo, EDTA).

Las composiciones de LNP de la presente divulgación se pueden proporcionar como una forma líquida congelada o una forma liofilizada. Se pueden utilizar numerosos crioprotectores, que incluyen, sin limitación, sacarosa, trehalosa, glucosa, manitol, manosa, dextrosa y similares. El crioprotector puede constituir del 5 al 30 % (p/v) de la composición de LNP. En algunas realizaciones,

la composición de LNP comprende trehalosa, por ejemplo, del 5 al 30 % (por ejemplo, el 10 %) (p/v). Una vez formuladas con el crioprotector, las composiciones de LNP se pueden congelar (o liofilizar y crioconservar) a de -20 °C a -80 °C.

- 5 Las composiciones de LNP se pueden proporcionar a un paciente en una solución tamponada acuosa, descongeladas si se congelaron previamente, o si se liofilizaron previamente, reconstituidas en una solución tamponada acuosa junto al enfermo. La solución tamponada puede ser isotónica y adecuada para, p. ej., la inyección intramuscular o intradérmica. En algunas realizaciones, la
10 solución tamponada es una solución salina tamponada con fosfato (PBS).

VIII. Procesos para fabricar vacunas con LNP

- Las LNP del presente documento se pueden preparar mediante diversas técnicas. Por ejemplo, pueden prepararse vesículas multilaminares (VML) de acuerdo con técnicas convencionales, tales como depositar un lípido
15 seleccionado en la pared interior de un recipiente o envase adecuado disolviendo el lípido en un disolvente apropiado y después evaporando el disolvente para dejar una película fina en el interior del envase o secando mediante pulverización. Después, puede añadirse una fase acuosa al recipiente con un movimiento vorticial que da como resultado la formación de las VML. A
20 continuación, pueden formarse vesículas unilaminares (VUL) mediante homogeneización, sonicación o extrusión de las vesículas multilaminares. Además, las vesículas unilaminares pueden formarse mediante técnicas de eliminación de detergente.

- Se describen diversos métodos en las publicaciones de solicitud de
25 patente n.º US 2011/0244026, US 2016/0038432, US 2018/0153822, US 2018/0125989 y US 2021/0046192 y se pueden utilizar para fabricar vacunas con LNP. Un proceso ilustrativo implica encapsular ARNm mediante la mezcla con una mezcla de lípidos, sin preformar primero los lípidos en nanopartículas lipídicas, como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE. UU.
30 n.º US 2016/0038432. Otro proceso ilustrativo implica encapsular ARNm mediante la mezcla de LNP preformadas con ARNm, como se describe en la publicación de solicitud de patente n.º US 2018/0153822.

En algunas realizaciones, el proceso de preparación de LNP cargadas con ARNm incluye una etapa de calentar una o más de las soluciones a una temperatura mayor que la temperatura ambiente, siendo la una o más soluciones la solución que comprende las nanopartículas lipídicas preformadas, comprendiendo la solución el ARNm y la solución mixta que comprende el ARNm encapsulado en LNP. En algunas realizaciones, el proceso incluye la etapa de calentar una o las dos soluciones de ARNm y la solución de LNP previamente formadas, antes de la etapa de mezclado. En algunas realizaciones, el proceso incluye calentar una o más de las soluciones que comprenden las LNP previamente formadas, la solución que comprende el ARNm y la solución que comprende el ARNm encapsulado en LNP, durante la etapa de mezclado. En algunas realizaciones, el proceso incluye la etapa de calentar el ARNm encapsulado en LNP, después de la etapa de mezclado. En algunas realizaciones, la temperatura a la que se calienta una o más de las 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 calienta una o más de las soluciones varía de aproximadamente 25 a 70 °C, aproximadamente 30 a 70 °C, aproximadamente 35 a 70 °C, aproximadamente 40 a 70 °C, aproximadamente 45 a 70 °C, aproximadamente 50 a 70 °C o aproximadamente 60 a 70 °C. En algunas realizaciones, la temperatura es de aproximadamente 65 °C.

Para preparar una solución de ARNm adecuada para la presente divulgación, pueden utilizarse varios métodos. 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 madre de ARNm con una solución tampón antes de mezclarla con una solución de lípidos para la encapsulación. En algunas realizaciones, una solución de ARNm puede generarse mezclando una solución madre de ARNm con una solución tampón justo antes de mezclarla con una solución de lípidos para la encapsulación. En algunas realizaciones, una solución madre de ARNm adecuada puede contener ARNm en agua o 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 madre de ARNm se mezcla con una solución tampón utilizando una bomba. Las bombas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, bombas de engranaje, bombas peristálticas y bombas centrífugas. Normalmente, la solución tampón se mezcla en una tasa mayor que la de la solución madre 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 madre de ARNm. En algunas realizaciones, una solución tampón se mezcla a un caudal que varía de aproximadamente 100-6000 ml/minuto (por ejemplo, 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 un caudal 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 madre de ARNm se mezcla a un caudal que varía de aproximadamente 10-600 ml/minuto (por ejemplo, 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 entre 480-600 ml/minuto). En algunas realizaciones, una solución madre de ARNm se mezcla a un caudal de o mayor de 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 proceso de incorporación de un ARNm deseado en una nanopartícula lipídica se denomina "carga". En Lasic et al., *FEBS Lett.* (1992) 312:255-8, se describen métodos ilustrativos. Los ácidos nucleicos incorporados en LNP pueden estar total o parcialmente ubicados 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 en 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 LNP adecuadas pueden fabricarse en varios tamaños. En algunas realizaciones, un tamaño reducido de las nanopartículas lipídicas se asocia con un suministro más eficaz de un ARNm. La selección de un tamaño de la LNP adecuado puede tener en cuenta el sitio de la célula o tejido diana y, hasta cierto punto, la aplicación para la que se fabrica la nanopartícula lipídica.

Hay una variedad de métodos disponibles para determinar el tamaño de una población de nanopartículas lipídicas. En varias realizaciones, los métodos en el presente documento utilizan Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical) para medir el tamaño de partículas de las LNP. En un protocolo, se mezclan 10 µl de una muestra de LNP con 990 µl de trehalosa al 10 %. Esta solución se carga en una cubeta y después se introduce en la máquina Zetasizer. El diámetro promedio z (nm), o la media de los cumulantés, se considera el tamaño promedio de las LNP en la muestra. La máquina Zetasizer también se puede utilizar para medir el índice de polidispersidad (PDI, del inglés *polydispersity index*) mediante el uso de dispersión dinámica de luz (DLS, del inglés *dynamic light scattering*) y análisis acumulativo de la función de autocorrelación. El diámetro promedio de las LNP puede reducirse mediante sonicación de las LNP formadas. Los ciclos de sonicación intermitentes se pueden alternar con una evaluación de dispersión de luz cuasi elástica (QELS, del inglés *quasi-elastic light scattering*) para guiar la síntesis eficaz de las nanopartículas lipídicas.

En algunas realizaciones, la mayoría de las LNP purificadas, es decir, más de aproximadamente el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las LNP, 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, sustancialmente todas (es decir, más del 80 % o 90 %) las nanopartículas lipídicas purificadas tienen un tamaño de aproximadamente 70 a 150 nm (por ejemplo, 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 determinadas realizaciones, la LNP tiene un diámetro promedio de 30 a 200 nm.

En diversas realizaciones, la LNP tiene un diámetro promedio de 80 nm a 150 nm.

En algunas realizaciones, las LNP de la composición del presente documento tienen un tamaño promedio 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 un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de las LNP en la presente composición tienen un tamaño que varía de aproximadamente 40 a 90 nm (por ejemplo, aproximadamente de 45 a 85 nm, aproximadamente de 50 a 80 nm, aproximadamente de 55 a 75 nm, aproximadamente de 60 a 70 nm) o aproximadamente de 50 a 70 nm (por ejemplo, de 55 a 65 nm) y son adecuadas para el suministro pulmonar mediante nebulización.

En algunas realizaciones, la dispersión, o medida de la heterogeneidad del tamaño de las moléculas (PDI), de las LNP en una composición farmacéutica

proporcionada por la presente divulgación, es inferior a aproximadamente 0.5. En algunas realizaciones, una LNP tiene un PDI inferior a aproximadamente 0.5, inferior a aproximadamente 0.4, inferior a aproximadamente 0.3, inferior a aproximadamente 0.28, inferior a aproximadamente 0.25, inferior a aproximadamente 0.23, inferior a aproximadamente 0.20, inferior a aproximadamente 0.18, inferior a aproximadamente 0.16, inferior a aproximadamente 0.14, inferior a aproximadamente 0.12, inferior a aproximadamente 0.10 o inferior a aproximadamente 0.08. El PDI puede medirse mediante una máquina Zetasizer como se describe anteriormente.

En algunas realizaciones, más de aproximadamente un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de las LNP purificadas en una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento encapsulan un ARNm dentro de cada partícula individual. En algunas realizaciones, sustancialmente todas (por ejemplo, más del 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 eficacia de encapsulación del 50 % al 99 %; o mayor que aproximadamente un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 92 %, un 95 %, un 98 % o un 99 %. Normalmente, las nanopartículas lipídicas para su uso en el presente documento tienen una eficacia de encapsulación de al menos un 90 % (por ejemplo, al menos un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 % o un 95 %).

En algunas realizaciones, una LNP tiene una proporción N/P de 1 a 10. En algunas realizaciones, una nanopartícula lipídica tiene una proporción N/P superior a 1, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7 o aproximadamente 8. En diversas realizaciones, una LNP normal del presente documento tiene una proporción N/P de 4.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de acuerdo con 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 de aproximadamente

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
5 aproximadamente 100 µg, al menos aproximadamente 500 µg o al menos aproximadamente 1000 µg de ARNm encapsulado.

En algunas realizaciones, el ARNm se puede producir mediante síntesis química o mediante transcripción *in vitro* (TIV) de un molde de ADN. En el ejemplo 1 se describe un proceso ilustrativo para producir y purificar ARNm. En
10 este proceso, en un proceso de IVT, se utiliza un molde de ADNc para producir un transcrito de ARNm y el molde de ADN se degrada con una DNasa. El transcrito se purifica mediante filtración profunda y filtración de flujo tangencial (TFF, del inglés *tangential flow filtration*). El transcrito purificado se modifica además mediante la adición de una caperuza y una cola, y el ARN modificado
15 se purifica nuevamente mediante filtración profunda y TFF.

A continuación, el ARNm se prepara en un tampón acuoso y se mezcla con una solución anfifílica que contiene los componentes lipídicos de las LNP. Una solución anfifílica para disolver los cuatro componentes lipídicos de las LNP puede ser una solución de alcohol. En algunas realizaciones, el alcohol es etanol.
20 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
25 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 proceso ilustrativo no limitante para preparar una composición de ARNm-LNP implica mezclar una solución de ARNm tamponada con una solución de lípidos en etanol de una manera homogénea controlada, donde la proporción
30 de lípidos:ARNm se mantiene durante todo el proceso de mezcla. En este ejemplo ilustrativo, el ARNm se presenta en un tampón acuoso que contiene ácido cítrico monohidratado, citrato trisódico dihidratado y cloruro de sodio. La

solución de ARNm se añade a la solución (tampón 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 en etanol se mezclan en una proporción en volumen de 4:1 en un mezclador "T" con un sistema de bomba casi "sin pulso". A continuación, la mezcla resultante se somete a purificación posterior e intercambio de tampón. El intercambio de tampón se puede lograr con casetes de diálisis o un sistema de TFF. La FFT se puede utilizar para concentrar e intercambiar con tampón la LNP naciente resultante inmediatamente después de la formación mediante el proceso de mezcla en T. El proceso de diafiltración es una operación continua, que mantiene el volumen constante mediante la adición del tampón apropiado al mismo ritmo que el flujo de permeado.

IX. Envasado y uso de la vacuna de ARNm-LNP

Las vacunas de ARNm-LNP se pueden formular o envasar para administración parenteral (por ejemplo, intramuscular, intradérmica o subcutánea) o administración nasofaríngea (por ejemplo, intranasal). En diversas realizaciones, las vacunas de ARNm-LNP pueden formularse o envasarse para administración pulmonar. En diversas realizaciones, las vacunas de ARNm-LNP pueden formularse o envasarse para administración intravenosa. Las composiciones de vacuna pueden estar en forma de una formulación extemporánea, donde la composición de LNP se liofiliza y se reconstituye con un tampón fisiológico (por ejemplo, PBS) justo antes de su uso. Las composiciones de vacuna también pueden enviarse y proporcionarse en forma de una solución acuosa o una solución acuosa congelada y pueden administrarse directamente a los sujetos sin reconstitución (después de descongelarlas, si están congeladas previamente).

En consecuencia, la presente divulgación proporciona un artículo de fabricación, tal como un kit, que proporciona la vacuna de ARNm-LNP en un único recipiente o proporciona la vacuna de ARNm-LNP en un recipiente (por ejemplo, un primer recipiente) y un tampón fisiológico para la reconstitución en otro recipiente (por ejemplo, un segundo recipiente). El(los) recipiente(s)

puede(n) contener una dosis de un solo uso o una dosis de usos múltiples. El(los) recipiente(s) puede(n) ser ampollas o viales de vidrio pretratados. El artículo de fabricación también puede incluir instrucciones de uso.

En determinadas realizaciones, se proporciona una vacuna de ARNm-LNP para su uso en inyección intramuscular (i.m.). La vacuna se puede inyectar a un sujeto, por ejemplo, en su músculo deltoides en la parte superior del brazo. En algunas realizaciones, la vacuna se proporciona en una jeringa o inyector precargado (por ejemplo, de una sola cámara o de múltiples cámaras). En algunas realizaciones, la vacuna se proporciona para su uso por inhalación y se proporciona en una bomba, aerosol o inhalador precargado.

En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos, polipéptidos, composiciones de la invención se proporcionan para su uso en la inyección cutánea, por ejemplo, en la epidermis, la dermis o la hipodermis de la piel. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos, polipéptidos, composiciones se proporcionan en un dispositivo adecuado para la inyección cutánea, tal como una aguja (por ejemplo, una aguja epidérmica, dérmica o hipodérmica), un dispositivo sin aguja, un dispositivo con microaguja o un dispositivo de matriz de microproyección. Se describen ejemplos de dispositivos con microaguja o de matriz de microproyección adecuados para la inyección cutánea de acuerdo con la invención en los documentos US20230270842A1, US20220339416A1, US20210085598A1, US20200246450A1, US20220143376A1, US20180264244A1, US20180263641A1 y US20110245776A1.

Las vacunas de ARNm-LNP se pueden administrar a sujetos que las necesiten en una cantidad profilácticamente eficaz, es decir, una cantidad que proporciona suficiente protección inmunitaria contra un patógeno diana durante un período de tiempo suficiente (por ejemplo, un año, dos años, cinco años, diez años o toda la vida). Una protección inmunitaria suficiente puede ser, por ejemplo, la prevención o el alivio de los síntomas asociados con infecciones por el patógeno. En algunas realizaciones, se administran (por ejemplo, se inyectan) múltiples dosis (por ejemplo, dos dosis) de la vacuna a sujetos que la necesitan para lograr los efectos profilácticos deseados. Las dosis (por ejemplo, primodosis y dosis de refuerzo) pueden estar separadas por un intervalo de al menos, por

ejemplo, 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.

X. Vectores

5 En un aspecto, en el presente documento se divulgan vectores que comprenden las composiciones de ARNm divulgadas en el presente documento. Las secuencias de ARN que codifican una proteína de interés (por ejemplo, ARNm que codifica una proteína F del RSV, una proteína F del hMPV o una proteína F del hPIV3) se pueden clonar en varios tipos de vectores. Por ejemplo,
10 los ácidos nucleicos se pueden clonar en un vector que incluye, pero no se limita a, un plásmido, un fagémido, un derivado de fago, un virus de animal y un cósmido. Los vectores de interés particular pueden incluir vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas, vectores de secuenciación y vectores optimizados para la transcripción *in vitro*.

15 En determinadas realizaciones, el vector se puede utilizar para expresar ARNm en una célula hospedadora. En diversas realizaciones, el vector se puede utilizar como molde para IVT. La construcción de ARNm por TIV traducido de manera óptima adecuado para uso terapéutico se divulga en detalle en Sahin, *et al.* (2014). Nat. Rev. Drug Discov. 13, 759–780; Weissman (2015). Expert Rev.
20 Vaccines 14, 265–281.

 En algunas realizaciones, los vectores divulgados en el presente documento pueden comprender al menos lo siguiente, de 5' a 3': un promotor de ARN polimerasa; una secuencia de polinucleótidos que codifica una UTR en 5'; una secuencia de polinucleótidos que codifica un ORF; una secuencia de
25 polinucleótidos que codifica una UTR en 3'; y una secuencia de polinucleótidos que codifica al menos un aptámero de ARN. En algunas realizaciones, los vectores divulgados en el presente documento pueden comprender una secuencia polinucleotídica que codifica una secuencia de poli(A) y/o una señal de poliadenilación.

30 Se conocen diversos promotores de ARN polimerasa. En algunas realizaciones, el promotor puede ser un promotor de ARN polimerasa T7. Otros promotores útiles pueden incluir, sin limitación, promotores de ARN polimerasa

T3 y SP6. Se conocen secuencias de nucleótidos consenso para los promotores T7, T3 y SP6.

También se divulgan en el presente documento células hospedadoras (p. ej., células de mamífero, p. ej., células humanas) que comprenden los vectores
5 o las composiciones de ARN que se divulgan en el presente documento.

Los polinucleótidos se pueden introducir en células diana utilizando cualquiera de varios métodos diferentes, por ejemplo, métodos disponibles comercialmente que incluyen, pero sin limitación, electroporación (Amara Nucleofector-II (Amara Biosystems, Colonia, Alemania)), (ECM 830 (BTX)
10 (Harvard Instruments, Boston, Mass.) o Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.), Multiporator (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), transfección mediada por liposomas catiónicos mediante lipofección, encapsulación de polímeros, transfección mediada por péptidos, sistemas de administración de partículas biológicas tales como "cañones de genes" (véase, por ejemplo, Nishikawa, *et al.*
15 (2001). Hum Gene Ther. 12(8):861-70, o el kit de transfección TransIT-RNA (Mirus, Madison, WI).

Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en
20 lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal ilustrativo para su uso como vehículo de administración *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (por ejemplo, una vesícula de membrana artificial).

Independientemente del método utilizado para introducir ácidos nucleicos
25 exógenos en una célula hospedadora o exponer de otro modo una célula al inhibidor de la presente divulgación, para confirmar la presencia de la secuencia de ARNm en la célula hospedadora se pueden realizar una variedad de ensayos.

XI. ARN autorreplicante y ARN transreplicante

ARN autorreplicante:

30 En un aspecto, en el presente documento se divulgan ARN autorreplicantes que codifican una proteína F del RSV, una proteína F del hMPV y/o una proteína hPIV3.

El ARN autorreplicante se puede producir mediante el uso de elementos de replicación procedentes de, por ejemplo, alfavirus, y la sustitución de las proteínas víricas estructurales por una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés (por ejemplo, una proteína F del RSV, una proteína F del hMPV y una proteína F del hPIV3). Un ARN autorreplicante es normalmente una molécula de cadena positiva que puede traducirse directamente después de su suministro a una célula, y esta traducción proporciona una ARN-polimerasa dependiente de ARN que después produce transcritos tanto de sentido y como de antisentido a partir del ARN suministrado. Por tanto, el ARN suministrado conduce a la producción de múltiples ARN de segunda generación. Estos ARN de segunda generación, así como los transcritos subgenómicos colineales, pueden traducirse ellos mismos para proporcionar la expresión *in situ* de un antígeno codificado (es decir, un antígeno de la proteína F del RSV, un antígeno de la proteína F del hMPV o un antígeno de la proteína F del hPIV3), o pueden transcribirse para proporcionar transcritos adicionales con el mismo sentido que el ARN suministrado que se traducen para proporcionar la expresión *in situ* del antígeno. El resultado global de esta secuencia de transcripciones es una gran amplificación en el número de replicones de ARN introducidos y, por tanto, el antígeno codificado se convierte en un producto polipeptídico importante de las células.

Un sistema adecuado para lograr la autorreplicación de esta manera es utilizar un replicón basado en alfavirus. Estos replicones son ARN de cadena positiva (cadena de sentido positivo) que conducen a la traducción de una replicasa (o replicasa-transcriptasa) después de su suministro a una célula. La replicasa se traduce como una poliproteína que se autoescinde para proporcionar un complejo de replicación que crea copias de la cadena genómica del ARN suministrado de cadena positiva. Estos transcritos de cadena negativa (-) pueden transcribirse ellos mismos para dar copias adicionales del ARN original de cadena positiva y también para dar un transcrito subgenómico que codifica el antígeno. La traducción del transcrito subgenómico conduce así a la expresión *in situ* del antígeno por parte de la célula infectada. Los replicones de alfavirus adecuados pueden utilizar una replicasa de un virus Sindbis, un virus

del bosque Semliki, un virus de la encefalitis equina oriental, un virus de la encefalitis equina venezolana, etc. Se pueden utilizar secuencias de virus mutantes o de tipo silvestre, por ejemplo, el mutante TC83 atenuado de VEEV se ha utilizado en replicones, véase la siguiente referencia: publicación
5 internacional n.º WO 2005/113782, que se incorpora en el presente documento por referencia.

En una realización, cada ARN autorreplicante descrito en el presente documento codifica (i) una ARN polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir ARN de la molécula de ARN autorreplicante y (ii) un antígeno proteico
10 F del RSV, un antígeno proteico F del hMPV o un antígeno proteico F del hPIV3. La polimerasa puede ser una replicasa de alfavirus, p. ej., que comprende una o más de las proteínas nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4 de alfavirus. Mientras que los genomas de alfavirus naturales codifican proteínas viriónicas estructurales además de la poliproteína replicasa no estructural, en determinadas
15 realizaciones, las moléculas de ARN autorreplicantes no codifican proteínas estructurales de alfavirus. Por tanto, el ARN autorreplicante puede conducir a la producción de copias de ARN genómico de sí mismo en una célula, pero no a la producción de viriones que contengan el ARN. La incapacidad de producir estos viriones significa que, a diferencia de un alfavirus de tipo silvestre, la molécula
20 de ARN autorreplicante no puede perpetuarse en forma infecciosa. Las proteínas estructurales de alfavirus que son necesarias para la perpetuación en virus de tipo silvestre están ausentes en los ARN autorreplicantes de la presente divulgación y su lugar lo ocupan genes que codifican el inmunógeno de interés, de modo que la transcripción subgenómica codifica el inmunógeno en lugar de
25 las proteínas estructurales del virión del alfavirus. Los ARN autorreplicantes se describen con más detalle en la publicación internacional n.º WO 2011/005799, incorporada en el presente documento como referencia.

ARN transreplicante:

En un aspecto, en el presente documento se divulgan ARN
30 transreplicantes que codifican una proteína F del RSV, una proteína F del hMPV y/o una proteína hPIV3.

El ARN transreplicante posee elementos similares a los del ARN autorreplicante descrito anteriormente. Sin embargo, con el ARN transreplicante se utilizan dos moléculas de ARN separadas. Una primera molécula de ARN codifica la ARN replicasa descrita anteriormente (por ejemplo, la replicasa de alfavirus) y una segunda molécula de ARN codifica la proteína de interés (por ejemplo, un antígeno proteico F del RSV, un antígeno proteico F del hMPV, un antígeno proteico F del hPIV3). La ARN replicasa puede replicar una o ambas de la primera y segunda molécula de ARN, aumentando así en gran medida el número de copias de las moléculas de ARN que codifican la proteína de interés.

Los ARN transreplicantes se describen con más detalle en la publicación internacional n.º WO 2017/162265, incorporada en el presente documento como referencia.

XII. Composiciones farmacéuticas

El ARN purificado de acuerdo con esta divulgación puede ser útil como componente en composiciones farmacéuticas, por ejemplo, para su uso como vacuna. Estas composiciones normalmente incluirán ARN y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente divulgación también puede incluir uno o más componentes adicionales, tales como inmunopotenciadores de molécula pequeña (por ejemplo, agonistas de TLR). Una composición farmacéutica de la presente divulgación también puede incluir un sistema de administración del ARN, tal como un liposoma, una emulsión de aceite en agua o una micropartícula. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una nanopartícula lipídica (LNP). En determinadas realizaciones, la composición comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno encapsulada dentro de una LNP.

XIII. Métodos de vacunación

Las composiciones de vacuna combinada de ARNm respiratorio divulgadas en el presente documento se pueden administrar a un sujeto para inducir una respuesta inmunitaria dirigida contra la proteína F del hRSV, la proteína F del hMPV y/o la proteína hPIV3, en donde un valor del anticuerpo antiantígeno en el sujeto aumenta después de la vacunación con respecto a un valor del anticuerpo antiantígeno en un sujeto que no está vacunado con las

composiciones divulgadas en el presente documento, o con respecto a una vacuna alternativa contra el hRSV, hMPV y/o hPIV3. Un "anticuerpo antiantígeno" es un anticuerpo sérico que se une específicamente al antígeno.

5 En un aspecto, la divulgación proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria contra el hRSV o un método para proteger a un sujeto contra una infección por hRSV que comprende administrar las composiciones descritas en el presente documento a un sujeto. En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria contra el hMPV o un método para proteger a un sujeto contra una infección por hMPV que
10 comprende administrar las composiciones descritas en el presente documento a un sujeto. En otro aspecto más, la divulgación proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria contra el hPIV3, o un método para proteger a un sujeto contra una infección por hPIV3 que comprende administrar las composiciones descritas en el presente documento a un sujeto.

15 La divulgación proporciona composiciones para su uso para provocar una respuesta inmunitaria contra el hRSV o para proteger a un sujeto contra una infección por hRSV que comprende administrar las composiciones descritas en el presente documento a un sujeto. La divulgación también proporciona composiciones descritas en el presente documento para su uso para provocar
20 una respuesta inmunitaria contra el hMPV o para proteger a un sujeto contra una infección por hMPV que comprende administrar las composiciones descritas en el presente documento a un sujeto. La divulgación proporciona además composiciones descritas en el presente documento para su uso para provocar una respuesta inmunitaria contra el hPIV3 o para proteger a un sujeto contra una
25 infección por hPIV3 que comprende administrar las composiciones descritas en el presente documento a un sujeto.

La divulgación proporciona composiciones descritas en el presente documento para su uso en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria contra el hRSV o proteger a un sujeto contra una infección
30 por hRSV. La divulgación también proporciona composiciones descritas en el presente documento para su uso en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria contra el hMPV o proteger a un sujeto contra

una infección por hMPV. La divulgación proporciona además composiciones descritas en el presente documento para su uso en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria contra el hPIV3 o proteger a un sujeto contra una infección por hPIV3.

5 En determinadas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento aumentan la concentración en suero de anticuerpos con especificidad de unión al sitio Ø de la proteína F del RSV. En determinadas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento aumentan la concentración en suero de anticuerpos con especificidad de unión al sitio Ø de
10 la proteína F del hMPV. En determinadas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento aumentan la concentración en suero de anticuerpos con especificidad de unión al sitio Ø de la proteína F del hPIV3.

 En determinadas realizaciones, el sujeto tiene aproximadamente la misma o mayor concentración en suero de anticuerpos neutralizantes contra el RSV
15 después de la administración de las composiciones descritas en el presente documento, en relación con un sujeto al que se le administra una única composición antigénica que comprende un ORF de ARNm que codifica un antígeno proteico F del hRSV de SEQ ID NO: 1. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene aproximadamente la misma o mayor concentración en suero de
20 anticuerpos neutralizantes contra hMPV después de la administración de las composiciones descritas en el presente documento, en relación con un sujeto al que se le administra una única composición antigénica que comprende un ORF de ARNm que codifica un antígeno proteico F de hMPV de SEQ ID NO: 2. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene aproximadamente la misma o mayor
25 concentración en suero de anticuerpos neutralizantes contra hPIV3 después de la administración de las composiciones descritas en el presente documento, en relación con un sujeto al que se le administra una única composición antigénica que comprende un ORF de ARNm que codifica un antígeno proteico F de hPIV3 de SEQ ID NO: 3.

30 En determinadas realizaciones, el sujeto tiene una concentración en suero comparable de anticuerpos neutralizantes contra hRSV después de la administración de las composiciones descritas en el presente documento, en

- relación con un sujeto al que se le administra una vacuna proteica de hRSV. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene una concentración en suero comparable de anticuerpos neutralizantes contra hMPV después de la administración de las composiciones descritas en el presente documento, en
- 5 relación con un sujeto al que se le administra una vacuna proteica de hMPV. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene una concentración en suero comparable de anticuerpos neutralizantes contra hPIV3 después de la administración de las composiciones descritas en el presente documento, en relación con un sujeto al que se le administra una vacuna proteica de hPIV3.
- 10 En determinadas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento aumentan la concentración en suero de anticuerpos neutralizantes en un sujeto con inmunidad preexistente al hRSV. En determinadas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento aumentan la concentración en suero de anticuerpos neutralizantes
- 15 en un sujeto con inmunidad preexistente al hMPV. En determinadas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento aumentan la concentración en suero de anticuerpos neutralizantes en un sujeto con inmunidad hPIV3 preexistente.

EJEMPLOS

- 20 La descripción anterior de las realizaciones específicas revelará de manera tan detallada la naturaleza general de la divulgación que otros podrán, aplicando el conocimiento de los expertos en la técnica, modificar y/o adaptar fácilmente para diversas aplicaciones dichas realizaciones específicas, sin experimentación indebida, sin apartarse del concepto general de la presente
- 25 divulgación. Por lo tanto, se pretende que dichas adaptaciones y modificaciones estén dentro del significado y gama de equivalentes de las realizaciones divulgadas, basándose en el contenido y directrices presentadas en el presente documento. Debe entenderse que la fraseología o terminología del presente documento tiene fines descriptivos y no limitantes, de modo que la terminología
- 30 o fraseología de la presente memoria descriptiva debe ser interpretada por el experto en la técnica según el contenido y las directrices.

Ejemplo 1: ARNm que codifican la proteína F del hRSV, la proteína F del hMPV y la proteína F del hPIV3

Se seleccionaron las proteínas F del RSV F, F del hMPV y F del hPIV3 para realizar pruebas como una vacuna combinada basada en ARNm. La
5 proteína F denominada RSV FD1 corresponde a una proteína F TS del RSV. La proteína F denominada RSV FD3 corresponde a una proteína F del RSV prefusión. La proteína F denominada hMPV FD1 corresponde a una proteína F TS del hMPV. La proteína F denominada hMPV FD2 corresponde a una proteína F del hMPV prefusión. La proteína F denominada hPIV3 FD1 corresponde a una
10 proteína F TS del hPIV3. La proteína F denominada hPIV3 FD2 corresponde a una proteína F del hPIV3 prefusión. Las secuencias de aminoácidos para cada una de las proteínas F se enumeran a continuación.

hRSV FD1:

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTS
15 VITIELSNIKKKNCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTQATNNRARR
ELPRFMNYTLNNAKKTNTLSKKRKRRFLGFLLGVSASIAAGVAVSKVLHLEG
EVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLT SKVLDLKNYIDKQLLPIV NKQSCSISNIE
TVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTK
20 EGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKT
FSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP SDE
FDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITIIIIVILLSLIAVGLL
LYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO: 9)

25 hRSV FD3:

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTS
VITIELSNIKENKNCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMGSGNVGLGGAIAS
GVAVSKVLHLEGEVNKI KSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTFKVLDLKNYIDKQLL
PILNKQSCSISNPETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLS
30 LINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCW
KLHTSPLCTTNTKN GSNICLTRTRDRGWYCDNAGNV SFFPQAETCKVQSNRVF
CDTMNSRTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT

KCTASNKNRGIKTFSSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGE
PIINFYDPLVFPSEFDASISQVNELINQSLAFINQSDELLHNVNAGKSTTNIMIT
TIIIVIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN (SEQ ID NO: 1)

hMPV FD1:

5 MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTNVFTLEVGD
VENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAI
ALGVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNALKTTNEAVSTLGNGVRVLATAVR
ELKDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAI
SLDLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYM
10 VQLPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPN
EKDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVAL
SPLGALVACYKGVSCSIGSNRVGIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSK
VEGEQHVIGRVPVSSSFDPKFPEDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSS
AEKGNTGFIIVILIAVLGSSMILVSIFIIKKTKKPTGAPPELSGVTNNGFIPHN
15 (SEQ ID NO: 10)

hMPV FD2:

MSWKVVIIFSLLITPQHGLKESYLEESCSTITEGYLSVLRTGWYTVFTLEVGDV
ENLTCSDGPSLIKTELDLTKSALRELKTVSADQLAREEQIENPRQSRFVLGAIAL
GVATAAAVTAGVAIAKTIRLESEVTAIKNALKTTNEAVSTLGNGVRVLAfAVREL
20 KDFVSKNLTRAINKNKCDIDDLKMAVSFSQFNRRFLNVVRQFSDNAGITPAISL
DLMTDAELARAVSNMPTSAGQIKLMLENRAMVRRKGFGILIGVYGSSVIYMVQ
LPIFGVIDTPCWIVKAAPSCSEKKGNYACLLREDQGWYCQNAGSTVYYPNEK
DCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTTNYPCKVSTGRHPISMVALSPL
GALVACYKGVSCSIGSNRVGIKQLNKGCSYITNQDADTVTIDNTVYQLSKVEG
25 EQHVIGRVPVSSSFDPKFPEDQFNVALDQVFENIENSQALVDQSNRILSSAEK
GNTGFIIVILIAVLGSSMILVSIFIIKKTKKPTGAPPELSGVTNNGFIPHN

(SEQ ID NO: 2) (Los aminoácidos en minúscula indican un enlazador, un motivo *foldon*, un enlazador, un sitio de escisión de 3C-HRV, un enlazador, un marcador 8X-His y una región marcadora de estreptavidina II).

30 hPIV3 FD1:

MLISILSIITTMIMASHCQIDITKLQHVGVLVNSPKGMKISQNFETRYLILSLIPKIE
DSNSCGDQQIKQYKRLLDRLIPLYDGLKLQKDVIIVTNQESNENTDPRTERFFG

GVIGTIALGVATSAQITA AVALVEAKQAKSDIEKLKEAIRDTNKAVQSVQSSVGN
LIVAIKSVQDYVNKEIVPSIARLGCEAAGLQLGIALTQH YSELTNIFGDNIGSLQE
KGIKLQGIASLYRTNITEIFTTSTVDKYDIYDLLFTESIKVRVIDVDLNDYSITLQV
RLPLLTRLLNTQIYKVDSISYNIQNREWIPLPSHIMTKGAFLGGADVKECIEAF
5 SSYICPSDPGFVLNHEMESCLSGNISQCPRTTVTSDIVPRYAFVNGGVVANCIT
TTCTCNGIGNRINQPPDQGVKIITHKECNTIGINGMLFNTNKEGTlafYTPDDIT
LNNSVALDPIDISIELNKA KSDLEESKEWIRRSNQKLDSIGSWHQSSTTIIILIMM
IILFIINITIITIAIKYYRIQKRNRVDQNDKPYVLTNK

(SEQ ID NO: 11)

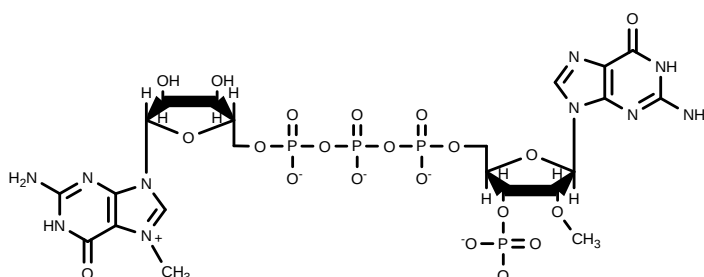
10 hPIV3 FD2:

MLISILSIITTMIMASHCQIDITKLQHVGVLVNSPKGMKISQNFETRYLILSLIPKIE
DSNSCGDQQIKQYKRLLDRLIPLYDGLKLQKDVIVTNQESNENTDPRTERFFG
GVIGTIALGVATSAQITA AVALVEAKQAKSDIEKLKEAIRDTNKAVQSVCSVGN
CIVA KSVQDYVNKEIVPSIARLGCEAAGLQLGIALTQH YSELTNCFGDNIGSLQ
15 EKG IKLQCIASLYRTNITEIFTTSTVDKYDIYDLLFTESIKVRVIDVDLNDYSITLQV
RLPLLTRLLNTQIYKVDSISYNIQNREWIPLPSHIMTKGAFLGGADVKECIEAF
SSYICPSDPGFVLNHEMESCLSGNISQCPRTTVTSDIVPRYAFVNGGVVANCIT
TTCTCNGIGNRINQPPDQGVKIITHKECNTIGINGMLFNTNKEGTlafYTPDDIT
LNNSVALDPIDISIELNKVKSDLEESKEWYRRSNQKLDSIGSWHQSSTTIIILIM
20 MIILFIINITIITIAIKYYRIQKRNRVDQNDKPYVLTNK

(SEQ ID NO: 3)

El ARNm descrito en el presente documento comprende un marco abierto
de lectura (ORF) que codifica un antígeno de la proteína F, al menos una región
no traducida en 5' (5' UTR), al menos una región no traducida en 3' (3' UTR) y al
25 menos una secuencia de poliadenilación (poli(A)). El ARNm comprende además
una caperuza en 5' con la siguiente estructura:

30



Las secuencias de ácido nucleico de cada uno de los marcos abiertos de lectura (ORF) de ARNm que codifican las proteínas hRSV FD3, hMPV FD2 y hPIV3 FD2 se enumeran a continuación.

ORF de ARNm de hRSV FD3:

```
5  AUGGAACUGCUGAUCCUCAAGCCAACGCAAUCACCACCAUUCUCACCG
   CUGUGACCUUCUGCUUCGCAUCGGGGCAGAACAUCACUGAAGAGUUUU
   ACCAGAGCACUUGCAGCGCGGUGUCAAGGGUUACCUUUCGCACUGC
   GGACCGGAUGGUACACUUCCGUGAUCACCAUUGAGCUCAGCAACAUCAA
   GGAAAACAAGUGCAAUGGCACCGACGCCAAGGUCAAGCUGAUCAAACAA
10  GAACUGGACAAGUACAAGAACGCCGUGACAGAAUUGCAGCUCCUGAUGG
   GAUCCGGAAACGUCGGUCUGGGCGGAGCCAUCGCGAGUGGAGUGGCUG
   UGUCCAAGGUCUUGCACCUCGAGGGAGAAGUGAACAAGAUCAAGUCCGC
   GCUGCUGUCAACGAACAAGGCCGUGGUGUCCCUGUCUAACGGCGUCAG
   CGUGCUGACGUUCAAGGUCCUGGACCUGAAGAAUUACAUUGACAAGCAG
15  CUGCUGCCCAUCCUCAACAAGCAAUCCUGCUCCAUCUCCAACCCCGAAA
   CCGUGAUCGAGUUCAGCAGAAGAACAACCGCCUGCUGGAAAUUACUCG
   CGAGUUCUCUGUGAAUGCCGGCGUGACCACCCUGUGUCCACCUACAU
   GCUGACCAACUCCGAGCUUCUCUCCCUUAUCAUGACAUGCCUAUCACG
   AACGACCAGAAGAAGCUGAUGUCGAACAACGUGCAGAUUGUGCGGCAGC
20  AGUCAUACAGCAUCAUGUCGAUCAUCAAGGAAGAAGUGCUGGCGUACGU
   GGUGCAACUCCCGCUGUACGGCGUCAUCGAUACCCCGUGCUGGAAGCU
   GCACACCUCGCCUUUGUGUACCACCAACACCAAGAACGGAUCCAACAUC
   UGCUUAACCCGGACUGAUCGGGGUUGGUACUGCGACAACGCCGGGAAU
   GUUUCGUUCUUCCCAAGCCGAGACUUGUAAAGUGCAGUCAAACAGAG
25  UGUUCUGUGACACCAUGAACUCGAGAACCCUGCCCAGCGAAGUGAACCU
   GUGUAACGUCGACAUCUUUAACCCAAAAUACGAUUGCAAGAUUAUGACC
   AGCAAAACCGACGUGUCCUCCUCCGUGAUACAAGCCUGGGGGCGAUU
   GUGUCAUGCUACGGAAAGACUAAGUGCACCGCCUCGAACAAGAACCGCG
   GCAUCAUUAAGACUUUCUGAAUGGUUGCGACUAUGUGUCCAACAAGGG
30  CGUGGAUACUGUGUCAGUCGGGAAUACUCUUUACUACGUGAACAAGCAG
   GAGGGGAAAAGCCUCUACGUGAAGGGAGAGCCUAUUUAUCAACUUUUACG
   AUCCGCUGGUGUUCCCGUCCGACGAAUUCGACGCCAGCAUCAGCCAAG
```

UCAACGAGCUGAUUAACCAGUCCCUCGCCUUCAUCAACCAAUCCGACGA
GCUCCUGCAUAACGUGAACGCCGGAAGUCCACCACCAACAUCAUGAUC
ACUACUAUUAUCAUCGUGAUAUCGUGAUCCUGCUGAGCCUGAUUGCUG
UGGGCCUGUUGCUGUAUUGCAAAGCCAGGUCCACCCCGGUCACCCUGU
5 CGAAGGAUCAGCUGUCCGGAAUCAACAACAUAUGCCUUCUCCAACUAA
(SEQ ID NO: 4)

ORF de ARNm de hMPV FD2:

AUGAGCUGGAAGGUUGUGAUUAUUUUCUCUCUGCUGAUUACUCCACAG
CACGGCCUGAAGGAGUCCUACCUGGAGGAGUCCUGUUCUACUAUCACU
10 GAGGGGUAUCUCUCUGUGCUGCGGACAGGGUGGUUAUACAGUGGUGUUC
ACCCUGGAGGUUGGCGAUGUGGAGAAUCUGACUUGCAGCGAUGGCCCCU
UCUCUGAUAAGACCGAGCUGGAUCUGACAAAAAGCGCCCUCAGAGAAC
UGAAAACCGUGUCCGCCGAUCAGCUGGCAAGGGAGGAGCAGAUCGAGA
ACCCACGGCAGAGCAGGUUUGUGCUGGGCGCUAUCGCUCUGGGCGUGG
15 CCACUGCAGCUGCUGUCACUGCAGGGGUCGCAAUCGCUAAGACUAUCA
GACUGGAUCCGAGGUGACCGCCAUAUAGAAUGCCCUGAAGACUACCAA
CGAGGCUGUGUCCACUCUGGGAAACGGAGUGAGGGUCCUGGCCUUCGC
AGUGAGGGAGCUGAAGGAUUUUGUGUCAAGAACCUUACACGGGCCAU
CAACAAGAAUAAGUGCGAUUAUCGAUGACCUGAAGAUGGCCGUGUCCUUC
20 UCCCAGUUCAACCGGCGCUUUCUGAAUGUGGUGCGCCAGUUUUCGAC
AACGCUGGAAUCACCCCUGCUAUCAGCCUGGACCUCAUGACCGACGCCG
AACUCGCAAGGGCCGUUUCUAACAUGCCUACAUCCGCUGGACAGAUUAA
GCUGAUGCUGGAGAAUAGAGCAAUGGUGAGGAGAAAGGGAUUCGGCAU
CCUGAUUGGCGUGUACGGAUCUAGCGUGAUCUACAUGGUGCAGCUGCC
25 GAUCUUCGGCGUGAUCGAUACUCCUUGUUGGAUCGUAAGGCCGCCCC
UCCUGCUCCGAGAAGAAGGGCAAUUACGCUUGUCUGCUGCGGGAGGA
CCAGGGCUGGUUAUUGCCAGAACGCCGGGUCUACAGUGUACUAUCCUAA
CGAGAAGGAUUGCGAGACCAGAGGCGACCACGUUUUCUGUGAUACAGC
CGCCGGAAUCAAUUGUCGCAGAGCAGUCUAAGGAGUGCAACAUAUAUC
30 UCUACAACCAAUAACCAUGUAAGGUGAGCACUGGACGGCACCCUAUCA
GUAUGGUGGCUCUGAGCCCACUGGGGGCACUGGUGGCUUGCUACAAGG
GGGUGAGCUGCAGUAUCGGCAGUAACAGAGUGGGCAUUAUCAAGCAGC

UGAACAAAGGGUGCUCUUAUAUUACAAACCAGGAUGCAGAUACUGUGAC
 CAUCGACAACACUGUGUACCAGCUGUCCAAGGUGGAGGGGGAGCAGCA
 UGUGAUCAAAGGGAGACCCGUCUCUUCUUCUUCGAUCCCAUCAAGUUC
 CCUGAAGACCAGUUCA AUGUUGCCCUGGACCAGGUUUUCGAGAACAUCG
 5 AAAAUAGCCAGGCCUUGGUCGAUCAAUCCAACAGGAUCCUGAGCAGCGC
 AGAGAAAGGGAACACUGGCUUCAUCAUCGUGAUCAUUCUGAUCGCCGUG
 CUGGGGAGCAGUAUGAUUCUGGUGUCCAUUUUUCAUCAUCAAGAAGA
 CCAAGAAGCCUACAGGAGCACCCCCUGAGCUGAGCGGAGUGACCAACAA
 CGGCUUUUAUCCCUACAACUAA
 10 (SEQ ID NO: 5)

ORF de ARNm de hPIV3 FD2:

AUGCUGAUUAGCAUUCUGUCCAUCAUCAACCAUGAUUAUGGCAAGUC
 ACUGUCAGAUCAUACCAAGCUCCAGCACGUGGGCGUGCUGGUGA
 AUUCCCCAAAGGGGAUGAAGAUUUCUCAGAACUUUGAGACUCGGUACCU
 15 GAUCCUGUCCCUGAUUCCUAAGAUUGAGGAUAGCAACUCCUGUGGCGA
 CCAGCAGAUCAAACAGUACAAACGCCUGCUGGACAGACUGAUCAUCCCA
 CUGUACGACGGCCUGAAGCUGCAGAAAGACGUCAUUGUUACAAACCAGG
 AAAGCAACGAGAAUACCGACCCUAGGACUGAGCGGUUCUUCGGGGGCG
 UCAUCGGAACAAUCGCACUGGGCGUUGCCACUAGCGCACAGAUACCCGC
 20 CGCCGUUGCACUGGUGGAGGCUAAGCAGGCAAAAUCUGACAUCGAGAA
 GCUGAAAGAAGCUAUCCGCGAUACCAACAAGGCCGUGCAGUCAGUGUGC
 UCCAGCGUCGGCAACUGCAUCGUUGCUAUUAAGUCCGUGCAGGACUAC
 GUGAACAAGGAGAUUCGUGCCCAGUAUCGCAAGGCUGGGAUGUGAGGCC
 GCUGGACUGCAGUUGGGGAUCGCUCUCACCCAGCACUACUCCGAGCUG
 25 ACAAUUGCUUCGGAGAUAAAUUCGGAUCUCUGCAGGAGAAGGGCAUCA
 AACUGCAGUGUAUUGCCUCCCUGUACAGAACAAUAUCACAGAGAUUUU
 CACAACCAGCACUGUCGACAAUAUGAUUAUCUAUGACCUGCUGUUCACC
 GAGUCCAUAUAGGUGCGGGUCAUCGACGUUGACCUGAACGAUUAUUC
 AUCACCCUCCAGGUGAGACUGCCUCUGCUGACACGGCUGCUGAACACU
 30 CAGAUCAACAAGGUCGACUCCAUCAGCUACAACAUCAGAACCGCGAGU
 GGUACAUCCACUGCCUAGCCACAUCAUGACAAAGGGCGCUUUUCUGG
 GAGGAGCUGAUGUGAAGGAAUGCAUUGAGGCCUUCAGCAGCUACAUCU

GCCCUUCCGAUCCCGGCUUCGUCCUGAACCACGAGAUGGAGAGCUGUC
 UGAGCGGGAACAUUAGCCAGUGCCCCAGGACAACCGUCACCUCUGACAU
 UGUGCCAAGGUAUGCCUUCGUGAACGGCGGAGUGGUUGCCAAUUGCAU
 CACCACUACAUGCACUUGCAAUGGGGAUUGGCAACAGGAUCAACCAGCCA
 5 CCAGACCAGGGGGUGAAAAUCAUUACACACAAAGAGUGCAACACCAUCG
 GCAUCAACGGAAUGCUGUUAUACCAACAAGGAGGGCACCUGGCCUU
 CUACACACCCGAUGACAUCACCCUGAACAAUAGCGUGGCUCUGGAUCCC
 AUUGAUUAUCAGCAUUGAGCUGAAUAAGGUCAAGUCUGAUCUGGAGGAGA
 GCAAGGAGUGGUUAUAGACGGUCUAAUCAGAAGCUCGACUCUAUCGGAUC
 10 CUGGCACCAGUCCUCCACAACAAUCAUCAUUAUCCUGAUGAUGAUC
 AUCCUGUUAUCAUCAACAUCACAAUUAUCACCAUUGCCAUCAAGUAUUA
 CCGGAUUCAGAAGCGGAUUCGCGUUGACCAGAACGACAAACCUUAUGUU
 CUGACCAACAAAUAA

(SEQ ID NO: 6)

15 Las secuencias de ácido nucleico para cada uno de los moldes de ADN
 que codifican los ARNm de hRSV FD3, hMPV FD2 y hPIV3 FD2 optimizados con
 codones se enumeran a continuación.

ADN de hRSV FD3:

ATGGAAGTGTGATCCTCAAAGCCAACGCAATCACCACCATTCTCACCGCT
 20 GTGACCTTCTGCTTCGCATCGGGGCAGAACATCACTGAAGAGTTTTACCA
 GAGCACTTGCAGCGCGGTGTCAAAGGGTTACCTTTCCGCACTGCGGACCG
 GATGGTACTTCCGTGATCACCATTGAGCTCAGCAACATCAAGGAAAACA
 AGTGCAATGGCACCGACGCCAAGGTCAAGCTGATCAAACAAGAACTGGAC
 AAGTACAAGAACGCCGTGACAGAATTGCAGCTCCTGATGGGATCCGGAAA
 25 CGTCGGTCTGGGCGGAGCCATCGCGAGTGGAGTGGCTGTGTCCAAGGTC
 TTGCACCTCGAGGGAGAAGTGAACAAGATCAAGTCCGCGCTGCTGTCAAC
 GAACAAGGCCGTGGTGTCCCTGTCTAACGGCGTCAGCGTGCTGACGTTCA
 AGGTCCTGGACCTGAAGAATTACATTGACAAGCAGCTGCTGCCCATCCTC
 AACAAAGCAATCCTGCTCCATCTCCAACCCCGAAACCGTGATCGAGTTCCA
 30 GCAGAAGAACAACCGCCTGCTGGAAATTACTCGCGAGTTCTCTGTGAATG
 CCGGCGTGACCACCCCTGTGTCCACCTACATGCTGACCAACTCCGAGCTT
 CTCTCCCTTATCAATGACATGCCTATCACGAACGACCAGAAGAAGCTGATG

TCGAACAACGTGCAGATTGTGCGGCAGCAGTCATACAGCATCATGTTCGAT
CATCAAGGAAGAAGTGCTGGCGTACGTGGTGCAACTCCCGCTGTACGGC
GTCATCGATACCCCGTGCTGGAAGCTGCACACCTCGCCTTTGTGTACCAC
CAACACCAAGAACGGATCCAACATCTGCTTAACCCGGACTGATCGGGGTT
5 GGTACTGCGACAACGCCGGGAATGTTTCGTTCTTCCCACAAGCCGAGACT
TGTAAGTGTCAGTCAAACAGAGTGTTCTGTGACACCATGAACTCGAGAACC
CTGCCCAGCGAAGTGAACCTGTGTAACGTCGACATCTTTAACCCAAAATAC
GATTGCAAGATTATGACCAGCAAAACCGACGTGTCCTCCTCCGTGATAACA
AGCCTGGGGGCGATTGTGTCATGCTACGGAAAGACTAAGTGCACCGCCTC
10 GAACAAGAACCGCGGCATCATTAAAGACTTTCTCGAATGGTTGCGACTATGT
GTCCAACAAGGGCGTGGATACTGTGTCAGTCGGGAATACTCTTTACTACGT
GAACAAGCAGGAGGGGAAAAGCCTCTACGTGAAGGGAGAGCCTATTATCA
ACTTTTACGATCCGCTGGTGTTCCTGTCGACGAATTCGACGCCAGCATC
AGCCAAGTCAACGAGCTGATTAACCAGTCCCTCGCCTTCATCAACCAATCC
15 GACGAGCTCCTGCATAACGTGAACGCCGGAAAGTCCACCACCAACATCAT
GATCACTACTATTATCATCGTGATCATCGTCATCCTGCTGAGCCTGATTGC
TGTGGGCCTGTTGCTGTATTGCAAAGCCAGGTCCACCCCGGTACCCCTGT
CGAAGGATCAGCTGTCCGGAATCAACAACATTGCCTTCTCCAATAA (SEQ
ID NO: 12)

20 ADN de hMPV FD2:

ATGAGCTGGAAGGTTGTGATTATTTTCTCTCTGCTGATTACTCCACAGCAC
GGCCTGAAGGAGTCCTACCTGGAGGAGTCCTGTTCTACTATCACTGAGGG
GTATCTCTCTGTGCTGCGGACAGGGTGGTATACAGTGGTGTTACCCCTGG
AGGTTGGCGATGTGGAGAATCTGACTTGCAGCGATGGCCCTTCTCTGATC
25 AAGACCGAGCTGGATCTGACAAAAAGCGCCCTCAGAGAACTGAAAACCGT
GTCCGCCGATCAGCTGGCAAGGGAGGAGCAGATCGAGAACCCACGGCAG
AGCAGGTTTGTGCTGGGCGCTATCGCTCTGGGCGTGGCCACTGCAGCTG
CTGTCACTGCAGGGGTCGCAATCGCTAAGACTATCAGACTGGAATCCGAG
GTGACCGCCATTAAGAATGCCCTGAAGACTACCAACGAGGCTGTGTCCAC
30 TCTGGGAAACGGAGTGAGGGTCCTGGCCTTCGCAGTGAGGGAGCTGAAG
GATTTTGTGTCAAAGAACCTTACACGGGCCATCAACAAGAATAAGTGCGAT
ATCGATGACCTGAAGATGGCCGTGTCCTTCTCCAGTTCAACCGGCGCTT

TCTGAATGTGGTGCGCCAGTTTTCCGACAACGCTGGAATCACCCCTGCTAT
 CAGCCTGGACCTCATGACCGACGCCGAACGCAAGGGCCGTTTCTAACA
 TGCCTACATCCGCTGGACAGATTAAGCTGATGCTGGAGAATAGAGCAATG
 GTGAGGAGAAAGGGATTTCGGCATCCTGATTGGCGTGTACGGATCTAGCGT
 5 GATCTACATGGTGCAGCTGCCGATCTTCGGCGTGATCGATACTCCTTGTTG
 GATCGTCAAGGCCGCCCTTCCTGCTCCGAGAAGAAGGGCAATTACGCTT
 GTCTGCTGCGGGAGGACCAGGGCTGGTATTGCCAGAACGCCGGGTCTAC
 AGTGTACTATCCTAACGAGAAGGATTGCGAGACCAGAGGCGACCACGTTT
 TCTGTGATACAGCCGCCGGAATCAATGTCGCAGAGCAGTCTAAGGAGTGC
 10 AACATCAATATCTCTACAACCAATTACCCATGTAAGGTGAGCACTGGACGG
 CACCCTATCAGTATGGTGGCTCTGAGCCCACTGGGGGCACTGGTGGCTTG
 CTACAAGGGGGTGAGCTGCAGTATCGGCAGTAACAGAGTGGGCATTATCA
 AGCAGCTGAACAAAGGGTGCTCTTATATTACAAACCAGGATGCAGATACTG
 TGACCATCGACAACACTGTGTACCAGCTGTCCAAGGTGGAGGGGGAGCA
 15 GCATGTGATCAAAGGGAGACCCGTCTCTTCTTCTTTTCGATCCCATCAAGTT
 CCCTGAAGACCAGTTCAATGTTGCCCTGGACCAGGTTTTTCGAGAACATCG
 AAAATAGCCAGGCCTTGGTTCGATCAATCCAACAGGATCCTGAGCAGCGCA
 GAGAAAGGGAACACTGGCTTCATCATCGTGATCATTCTGATCGCCGTGCT
 GGGGAGCAGTATGATTCTGGTGTCCATTTTCATCATCATCAAGAAGACCAA
 20 GAAGCCTACAGGAGCACCCCCTGAGCTGAGCGGAGTGACCAACAACGGC
 TTTATCCCTCACAATAA

(SEQ ID NO: 13)

ADN de hPIV3 FD2:

ATGCTGATTAGCATTCTGTCCATCATCACAACCATGATTATGGCAAGTCACT
 25 GTCAGATCGATATCACCAAGCTCCAGCACGTGGGCGTGCTGGTGAATTCC
 CCAAAGGGGATGAAGATTTCTCAGAACTTTGAGACTCGGTACCTGATCCTG
 TCCCTGATTCCTAAGATTGAGGATAGCAACTCCTGTGGCGACCAGCAGAT
 CAAACAGTACAAACGCCTGCTGGACAGACTGATCATCCCACTGTACGACG
 GCCTGAAGCTGCAGAAAGACGTCATTGTTACAAACCAGGAAAGCAACGAG
 30 AATACCGACCCTAGGACTGAGCGGTTCTTCGGGGGCGTCATCGGAACAAT
 CGCACTGGGCGTTGCCACTAGCGCACAGATCACCGCCGCCGTTGCACTG
 GTGGAGGCTAAGCAGGCAAAATCTGACATCGAGAAGCTGAAAGAAGCTAT

CCGCGATACCAACAAGGCCGTGCAGTCAGTGTGCTCCAGCGTCGGCAACT
 GCATCGTTGCTATTAAGTCCGTGCAGGACTACGTGAACAAGGAGATCGTG
 CCCAGTATCGCAAGGCTGGGATGTGAGGCCGCTGGACTGCAGTTGGGGA
 TCGCTCTCACCCAGCACTACTCCGAGCTGACAAATTGCTTCGGAGATAACA
 5 TCGGATCTCTGCAGGAGAAGGGCATCAAACCTGCAGTGTATTGCCTCCCTG
 TACAGAACAAATATCACAGAGATTTTCACAACCAGCACTGTGACAAATAT
 GATATCTATGACCTGCTGTTACCGAGTCCATTAAGGTGCGGGTCATCGAC
 GTTGACCTGAACGATTATTCCATCACCTCCAGGTGAGACTGCCTCTGCTG
 ACACGGCTGCTGAACACTCAGATCTACAAGGTCGACTCCATCAGCTACAA
 10 CATCCAGAACCGCGAGTGGTACATCCCCTGCCTAGCCACATCATGACAA
 AGGGCGCTTTTCTGGGAGGAGCTGATGTGAAGGAATGCATTGAGGCCTTC
 AGCAGCTACATCTGCCCTTCCGATCCCGGCTTCGTCCTGAACCACGAGAT
 GGAGAGCTGTCTGAGCGGGAACATTAGCCAGTGCCCCAGGACAACCGTC
 ACCTCTGACATTGTGCCAAGGTATGCCTTCGTGAACGGCGGAGTGGTTGC
 15 CAATTGCATCACCCTACATGCACTTGCAATGGGATTGGCAACAGGATCAA
 CCAGCCACCAGACCAGGGGGTGAAAATCATTACACACAAAGAGTGCAACA
 CCATCGGCATCAACGGAATGCTGTTCAATACCAACAAGGAGGGCACCTG
 GCCTTCTACACACCCGATGACATCACCTGAACAATAGCGTGGCTCTGGA
 TCCCATTGATATCAGCATTGAGCTGAATAAGGTCAAGTCTGATCTGGAGGA
 20 GAGCAAGGAGTGGTATAGACGGTCTAATCAGAAGCTCGACTCTATCGGAT
 CCTGGCACCAGTCCTCCACAACAATCATCATTATCCTGATCATGATGATCA
 TCCTGTTTCATCATCAACATCACAATTATCACCATTGCCATCAAGTATTACCG
 GATTCAGAAGCGGAATCGCGTTGACCAGAACGACAAACCTTATGTTCTGAC
 CAACAAATAA
 25 (SEQ ID NO: 14)

Las secuencias de ácido nucleico para la 5' UTR y 3' UTR (con respecto a F del hRSV, F del hMPV y F del hPIV3) se enumeran a continuación.

5' UTR:

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAA
 30 GACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAA
 CGCGGAUUCCCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG
 (SEQ ID NO: 7)

3' UTR:

CGGGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCCUGGA
AGUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGC
AUC

5 (SEQ ID NO: 8)

Las secuencias de ácido nucleico para cada uno de los ARNm de longitud completa que codifican las proteínas hRSV FD3, hMPV FD2 y hPIV3 FD2 se enumeran a continuación.

ARNm de hRSV FD3:

10 GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAA
GACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAA
CGCGGAUUCCCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGGA
ACUGCUGAUCCUCAAGCCAACGCAAUCACCACCAUUCUCACCGCUGUG
ACCUUCUGCUUCGCAUCGGGGCAGAACAUACUGAAGAGUUUUACCAGA
15 GCACUUGCAGCGCGGUGUCAAGGGUUACCUUCCGCACUGCGGACCG
GAUGGUACACUCCGUGAUCACCAUUGAGCUCAGCAACAUAAGGAAAA
CAAGUGCAAUGGCACCGACGCCAAGGUCAAGCUGAUCAAACAAGAACUG
GACAAGUACAAGAACGCCGUGACAGAAUUGCAGCUCCUGAUGGGGAUCCG
GAAACGUCGGUCUGGGCGGAGCCAUCGCGAGUGGAGUGGCUGUGUCCA
20 AGGUCUUGCACCUCGAGGGGAGAAGUGAACAAGAUCAAGUCCGCGCUGC
UGUCAACGAACAAGGCCGUGGUGUCCCUGUCUAACGGCGUCAGCGUGC
UGACGUUCAAGGUCCUGGACCUGAAGAAUUACAUUGACAAGCAGCUGCU
GCCCAUCCUCAACAAGCAAUCCUGCUCCAUCUCCAACCCCGAAACCGUG
AUCGAGUUCCAGCAGAAGAACAACCGCCUGCUGGAAAUUACUCGCGAGU
25 UCUCUGUGAAUGCCGGCGUGACCACCCCUGUGUCCACCUACAUGCUGA
CCAACUCCGAGCUUCUCUCCCUUAUCAUUGACAUGCCUAUCACGAACGA
CCAGAAGAAGCUGAUGUCGAACAACGUGCAGAUUGUGCGGCAGCAGUCA
UACAGCAUCAUGUCGAUCAUCAAGGAAGAAGUGCUGGCGUACGUGGUG
CAACUCCCGCUGUACGGCGUCAUCGAUACCCCGUGCUGGAAGCUGCAC
30 ACCUCGCCUUUGUGUACCACCAACACCAAGAACGGAUCCAACAUCUGCU
UAACCCGGACUGAUCGGGGUUGGUACUGCGACAACGCCGGGAAUGUUU
CGUUCUUCCCACAAGCCGAGACUUGUAAAGUGCAGUCAACAGAGUGUU

CUGUGACACCAUGAACUCGAGAACCCUGCCCAGCGAAGUGAACCUGUGU
 AACGUCGACAUCUUUAACCCAAAAUACGAUUGCAAGAUUAUGACCAGCAA
 AACCGACGUGUCCUCCUCCGUGAUACAAGCCUGGGGGCGAUUGUGUC
 AUGCUACGGAAAGACUAAGUGCACCGCCUCGAACAAGAACCGCGGCAUC
 5 AUUAAGACUUUCUGA AUGGUUGCGACUAUGUGUCCAACAAGGGCGUG
 GAUACUGUGUCAGUCGGGAAUACUCUUUACUACGUGAACAAGCAGGAGG
 GGAAAAGCCUCUACGUGAAGGGAGAGCCUAUUAUCAACUUUUACGAUCC
 GCUGGUGUUCCCGUCCGACGAUUCGACGCCAGCAUCAGCCAAGUCA
 CGAGCUGAUUAACCAGUCCCUCCGCCUUCAUCAACCAAUCCGACGAGCUC
 10 CUGCAUAACGUGAACGCCGGAAGUCCACCACCAACAUCAUGAUCACUA
 CUAUUAUCAUCGUGAUCAUCGUCAUCCUGCUGAGCCUGAUUGCUGUGG
 GCCUGUUGCUGUAUUGCAAAGCCAGGUCCACCCCGGUCACCCUGUCGA
 AGGAUCAGCUGUCCGGAUCAACAACAUUGCCUUCUCCAACUAACGGGU
 GGCAUCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUG
 15 CCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUC
 (SEQ ID NO: 15)

ARNm de hMPV FD2:

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAA
 GACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAA
 20 CGCGGAUUCCCCGUGCCAAGAGUGACUACCGUCCUUGACACGAUGAG
 CUGGAAGGUUGUGAUUAUUUUCUCUCUGCUGAUUACUCCACAGCACGG
 CCUGAAGGAGUCCUACCUGGAGGAGUCCUGUUCUACUAUCACUGAGGG
 GUAUCUCUCUGUGCUGCGGACAGGGUGGUUAUACAGUGGUGUUCACCCU
 GGAGGUUGGCGAUGUGGAGAAUCUGACUUGCAGCGAUGGCCCUUCUCU
 25 GAUCAAGACCGAGCUGGAUCUGACAAAAAGCGCCCUAGAGAACUGAAA
 ACCGUGUCCGCCGAUCAGCUGGCAAGGGAGGAGCAGAUCGAGAACCCA
 CGGCAGAGCAGGUUUGUGCUGGGCGCUAUCGCUCUGGGCGUGGCCAC
 UGCAGCUGCUGUCACUGCAGGGGUCGCAAUCGCUAAGACUAUCAGACU
 GGAAUCCGAGGUGACCGCCAUUAAGAAUGCCCUGAAGACUACCAACGAG
 30 GCUGUGUCCACUCUGGGAAACGGAGUGAGGGUCCUGGCCUUCGCAGUG
 AGGGAGCUGAAGGAUUUUGUGUCAAGAACCUUACACGGGCCAUCAACA
 AGAAUAAGUGCGAUUAUCGAUGACCUGAAGAUGGCCGUGUCCUUCUCCCA

GUUCAACCGGCGCUUUCUGAAUGUGGUGCGCCAGUUUUCGACAACGC
 UGGAUACACCCUGCUAUCAGCCUGGACCUCAUGACCGACGCCGAACUC
 GCAAGGGCCGUUUCUAACAUGCCUACAUCCGCUGGACAGAUUAAGCUGA
 UGCUGGAGAAUAGAGCAAUGGUGAGGAGAAAGGGAUUCGGCAUCCUGA
 5 UUGGCGUGUACGGAUCUAGCGUGAUCUACAUGGUGCAGCUGCCGAUCU
 UCGGCGUGAUCGAUACUCCUUGUUGGAUCGUCAAGGCCGCCCUUCCU
 GCUCCGAGAAGAAGGGCAAUUACGCUUGUCUGCUGCGGGAGGACCAGG
 GCUGGUAUUGCCAGAACGCCGGGUCUACAGUGUACUAUCCUAACGAGAA
 GGAUUGCGAGACCAGAGGGCGACCACGUUUUCUGUGAUACAGCCGCCGG
 10 AAUCAAUGUCGCAGAGCAGUCUAAGGAGUGCAACAUCAUAUCUCUACA
 ACCAAUUACCCAUGUAAGGUGAGCACUGGACGGCACCCUAUCAGUAUGG
 UGGCUCUGAGCCCACUGGGGGGCACUGGUGGCUUGC UACAAGGGGGUGA
 GCUGCAGUAUCGGCAGUAACAGAGUGGGCAUUAUCAAGCAGCUGAACAA
 AGGGUGCUCUUAUAUUACAAACCAGGAUGCAGAUACUGUGACCAUCGAC
 15 AACACUGUGUACCAGCUGUCCAAGGUGGAGGGGGAGCAGCAUGUGAUC
 AAAGGGAGACCCGUCUCUUCUUCUUCGAUCCCAUCAAGUUCCCUGAAG
 ACCAGUUCAAUGUUGCCCUGGACCAGGUUUUCGAGAACAUCGAAAAUAG
 CCAGGCCUUGGUCGAUCAAUCCAACAGGAUCCUGAGCAGCGCAGAGAAA
 GGGAACACUGGCUUCAUCAUCGUGAUCAUUCUGAUCGCCGUGCUGGGG
 20 AGCAGUAUGAUUCUGGUGUCCAUUUUUCAUCAUCAUCAAGAAGACCAAGA
 AGCCUACAGGAGCACCCCCUGAGCUGAGCGGAGUGACCAACAACGGCU
 UUAUCCCUCACAACUAACGGGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCCCCAGUGC
 CUCUCCUGGCCCUUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCC
 UAAUAAAAUUAAGUUGCAUC

25 (SEQ ID NO: 16)

ARNm de hPIV3 FD2:

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAA
 GACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAA
 CGCGGAUUCCCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGCU
 30 GAUUAGCAUUCUGUCCAUCAUCAACAACCAUGAUUAUGGCAAGUCACUGU
 CAGAUCGAUAUACCAAGCUCCAGCACGUGGGCGUGCUGGUGAAUUCC
 CCAAAGGGGAUGAAGAUUUCUCAGAACUUUGAGACUCGGUACCUGAUCC

UGUCCCUGAUUCCUAAGAUUGAGGAUAGCAACUCCUGUGGCGACCAGCA
 GAUCAAACAGUACAAACGCCUGCUGGACAGACUGAUCAUCCACUGUAC
 GACGGCCUGAAGCUGCAGAAAGACGUCAUUGUUACAAACCAGGAAAGCA
 ACGAGAAUACCGACCCUAGGACUGAGCGGUUCUUCGGGGGCGUCAUCG
 5 GAACAAUCGCACUGGGCGUUGCCACUAGCGCACAGAUCACCGCCGCCG
 UUGCACUGGUGGAGGCUAAGCAGGCAAAAUCUGACAUCGAGAAGCUGAA
 AGAAGCUAUCCGCGAUACCAACAAGGCCGUGCAGUCAGUGUGCUCCAGC
 GUCGGCAACUGCAUCGUUGCUAUUAAGUCCGUGCAGGACUACGUGAAC
 AAGGAGAUCGUGCCCAGUAUCGCAAGGCUGGGAUGUGAGGGCCGCUGGA
 10 CUGCAGUUGGGGAUCGCUCUCACCCAGCACUACUCCGAGCUGACAAAUU
 GCUUCGGAGAUAAAUUCGGAUCUCUGCAGGAGAAGGGCAUCAAACUGCA
 GUGUAUUGCCUCCCUGUACAGAACAAAUUACACAGAGAUUUUCACAACC
 AGCACUGUCGACAAAUUGAUUAUCUAUGACCUGCUGUUCACCGAGUCCA
 UUAAGGUGCGGGUCAUCGACGUUGACCUGAACGAUUUUAUCCAUCACCCU
 15 CCAGGUGAGACUGCCUCUGCUGACACGGCUGCUGAACACUCAGAUCUA
 CAAGGUCGACUCCAUCAGCUACAACAUCCAGAACC GCGAGUGGUACAUC
 CCACUGCCUAGCCACAUAUGACAAAGGGCGCUUUUCUGGGAGGAGCU
 GAUGUGAAGGAUUGCAUUGAGGCCUUCAGCAGCUACAUCUGCCCUUCC
 GAUCCCGGCUUCGUCCUGAACCACGAGAUGGAGAGCUGUCUGAGCGGG
 20 AACAUUAGCCAGUGCCCCAGGACAACCGUCACCUCUGACAUUGUGCCAA
 GGUAUGCCUUCGUGAACGGCGGAGUGGUUGCCAAUUGCAUCACCACUA
 CAUGCACUUGCAAUGGGAUUGGCAACAGGAUCAACCAGCCACCAGACCA
 GGGGGUGAAAAUCAUUACACACAAAGAGUGCAACACCAUCGGCAUCAAC
 GGAAUGCUGUUAUACCAACAAGGAGGGGCACCCUGGCCUUCUACACAC
 25 CCGAUGACAUCACCCUGAACAAUAGCGUGGCUCUGGAUCCCAUUGAUUAU
 CAGCAUUGAGCUGAAUAAGGUCAAGUCUGAUCUGGAGGAGAGCAAGGA
 GUGGUUAUAGACGGUCUAAUCAGAAGCUCGACUCUAUCGGAUCCUGGCA
 CCAGUCCUCCACAACAAUCAUCAUUAUCCUGAUCAUGAUGAUCAUCCUG
 UUCAUCAUCAACAUCACAAUUAUCACCAUUGCCAUCAAGUAUUACCGGAU
 30 UCAGAAGCGGAUUCGCGUUGACCAGAACGACAAACCUUAUGUUCUGACC
 AACAAUAACGGGUGGCAUCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUG

GCCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAU
UAAGUUGCAUC

(SEQ ID NO: 17)

Ejemplo 2: estudios de compatibilidad de ARNm prefusión del hRSV, hMPV y

5 hPIV3

Se probó la compatibilidad de las proteínas F del hRSV, F del hPIV3 y F del hMPV prefusión mencionadas anteriormente cuando se formularon o administraron conjuntamente en una proporción de 1:1:1 *in vitro* en células del músculo esquelético humano (hSKM) e *in vivo* en ratones. Se sintetizaron
10 versiones de longitud completa de la proteína del hRSV prefusión, la proteína del hPIV3 prefusión y la proteína del hMPV prefusión como ARNm y se formularon como formulaciones monovalentes de ARNm-LNP y coformulaciones trivalentes de ARNm-LNP en una proporción 1:1:1. Para probar la coadministración de las proteínas del hRSV, hMPV y hPIV3 prefusión *in vivo*, la formulación monovalente
15 de ARNm-LNP de cada inmunógeno se combinó justo antes de la inmunización en una proporción de 1:1:1 para crear una mezcla. Se formularon construcciones de ARNm con LNP OF-02, a menos que se indique de otro modo.

Con respecto a estudios *in vitro*, las células hSKM se transfectaron con coformulaciones trivalentes de ARNm-LNP de hRSV:hMPV:hPIV3 y con
20 formulaciones monovalentes de ARNm-LNP de ARNm del hRSV prefusión, ARNm del hPIV3 prefusión o ARNm del hMPV prefusión en dosis que varían de 0.088 µg a 3 µg. La interferencia entre los componentes de cada formulación se determinó mediante citometría de flujo mediante la evaluación de los niveles de expresión de los epítomos específicos de F prefusión y los epítomos de la región
25 común, que se calculó como intensidad de fluorescencia media integrada (IFMi). La transfección con formulaciones monovalentes de ARNm-LNP de F del hRSV, F del hMPV y F del hPIV3 prefusión dio como resultado una expresión sólida y específica de la dosis con patrones similares tanto para los epítomos F prefusión como para los epítomos de la región común, lo que indica que los sitios de
30 unión del anticuerpo monoclonal de F prefusión se conservaron bien en las tres construcciones después de la expresión del ARNm. La transfección con las coformulaciones trivalentes de ARNm-LNP produjo patrones de expresión

similares a los que siguen a la transfección monovalente para RSV y PIV3, como se muestra en las **figuras 1A a 1D**. Sin embargo, a niveles de dosis más elevados, la expresión de epítomos F del hMPV en células transfectadas con las coformulaciones trivalentes de ARNm-LNP fue menor que la expresión de epítomos F del hMPV en células después de la transfección monovalente, como se muestra en la **figura 1E**. Por ejemplo, a la dosis de 3 µg, la IFMi para el epítomo F del hMPV prefusión de la coformulación trivalente de ARNm-LNP fue 3 veces menor que la de la formulación monovalente de ARNm-LNP para hMPV. La IFMi para el epítomo de la región común del hMPV de la coformulación trivalente de ARNm-LNP fue 2 veces menor que la de la formulación monovalente de ARNm-LNP para hMPV, como se muestra en la **figura 1F**.

Con respecto a los estudios *in vivo*, la interferencia se determinó mediante la comparación de la inmunogenia en ratones vacunados con las coformulaciones trivalentes de ARNm-LNP (que contienen 0.5 µg de ARNm del hRSV prefusión, 0.5 µg de ARNm del hPIV3 prefusión y 0.5 µg de ARNm del hMPV prefusión por dosis) o una mezcla de las tres formulaciones monovalentes de ARNm-LNP (que contenían 0.5 µg/dosis de ARNm del hRSV prefusión, 0.5 µg/dosis de ARNm del hPIV3 prefusión y 0.5 µg/dosis de ARNm del hMPV prefusión), con ratones vacunados solo con formulaciones monovalentes de ARNm-LNP (que contenían 0.5 µg/dosis de ARNm del hRSV prefusión, ARNm del hPIV3 prefusión o ARNm del hMPV prefusión). Los valores de los anticuerpos de unión se determinaron mediante ELISA usando placas recubiertas con hRSV hPIV3 o hMPV prefusión. Los valores de los anticuerpos neutralizantes se determinaron mediante microneutralización contra hRSV, hPIV3 o hMPV que expresan indicadores de proteína fluorescente verde (GFP). Los tres regímenes de inmunización (es decir, regímenes coformulados, mezcla y monovalentes) indujeron niveles similares de valores de anticuerpos de unión y de anticuerpos neutralizantes contra RSV y hPIV3, como se muestra en las **figuras 2A a 2D**. Sin embargo, los valores de los anticuerpos de unión a hMPV inducidos por las coformulaciones trivalentes de ARNm-LNP fueron 2.7 veces más bajos ($p < 0.001$) y la mezcla de las tres formulaciones monovalentes de ARNm-LNP fue 2.0 veces más baja ($p = 0.0096$), en comparación con los inducidos por la

inmunización monovalente con hMPV, como se muestra en la **figura 2E**. De manera similar, los valores de los anticuerpos de neutralización inducidos por las coformulaciones trivalentes de ARNm-LNP fueron 4.9 veces más bajos ($p < 0.001$) y la mezcla de las tres formulaciones monovalentes de ARNm-LNP fue 2.6 veces más baja ($p = 0.0107$), en comparación con los inducidos por la
5 inmunización monovalente con hMPV, como se muestra en la **figura 2F**.

Los datos de los estudios anteriores demuestran que cuando se coformularon o coadministraron ARNm del hRSV prefusión, ARNm del hMPV prefusión y ARNm del hPIV3 prefusión en una proporción de 1:1:1, se produjo
10 una supresión de la expresión de la proteína del hMPV *in vitro* y de la inmunogenia del hMPV en ratones en relación con la inmunización monovalente con hMPV. No se demostró ningún impacto en la expresión o inmunogenia de las proteínas del hRSV ni del hPIV3.

Ejemplo 3: Estudios de mezcla trivalente e inmunogenia del hMPV

15 Para determinar si la inhibición de la inmunogenia del hMPV se debe principalmente a la disminución de la expresión de proteínas observada *in vitro* o si había un componente de inmunodominancia adicional, se evaluó la compatibilidad de los tres inmunógenos (es decir, hRSV, hMPV y hPIV3) cuando se administraron como proteínas recombinantes. Después de la inmunización de
20 ratones con una mezcla 1:1:1 de proteínas recombinantes con adyuvante, los valores de los anticuerpos de unión inducidos contra hRSV y hMPV no variaron significativamente de los inducidos por la inmunización con controles de proteínas monovalentes, mientras que aquellos contra hPIV3 fueron 3.3 veces más bajos ($p = 0.0118$) que en el grupo que recibió solo hPIV3, como se muestra
25 en las **figuras 3A a 3C**. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la inducción de anticuerpos neutralizantes contra cualquier diana entre los grupos inmunizados con mezcla de proteínas y los grupos inmunizados con proteína monovalente, como se muestra en las **figuras 3D a 3F**. Los datos de este estudio demuestran que es probable que se produzca interferencia en el nivel de
30 expresión del ARNm sin componente de inmunodominancia.

Para determinar si la inhibición de la inmunogenia del hMPV podría superarse con ajustes de dosis mediante la alteración de la proporción de los

ARNm de hRSV, hMPV y hPIV3 prefusión en la mezcla, se probaron dos enfoques: (1) la dosis de hMPV aumentó 2 o 5 veces en relación con las dosis de hRSV y hPIV3; y (2) la dosis de hPIV3 se redujo 5 veces con respecto a las dosis de hRSV y hMPV, como se muestra a continuación en la tabla 1. Las construcciones de ARNm se formularon con LNP OF-02, a menos que se indique de otro modo.

Tabla 1 – Dosis/proporciones de mezcla de ARNm de hRSV, hMPV y hPIV3 prefusión probados con LNP OF-02

Grupo	Modalidad	Proporción hRSV:hMPV:hPIV3	Dosis (µg)
1	ARNm	1:1:1	0.5, 0.5, 0.5
2	ARNm	1:1: <u>0.2</u>	0.5, 0.5, <u>0.1</u>
3	ARNm	1: <u>2</u> :1	0.5, <u>1</u> , 0.5
4	ARNm	1: <u>5</u> :1	0.5, <u>2.5</u> , 0.5
5	ARNm	hMPV alone 1x dose	0.5 (monovalent control for 1x dose of hMPV)
6	ARNm	hPIV3 alone 1/5 dose	0.1 (monovalent control for 1/5 dose of hPIV3)

El efecto de los aumentos de dosis de hMPV en estudios de mezcla se investigó en grupos de ratones inmunizados con una mezcla 1:1:1, 1:2:1 o 1:5:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 o ARNm del hMPV monovalente (que contenía 0.5 µg/dosis de ARNm del hMPV prefusión). Los valores de los anticuerpos inducidos por estos regímenes se compararon con los inducidos por una mezcla 1:1:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 y, solo para hMPV, con los inducidos por ARNm del hMPV monovalente.

Aumentar la dosis de hMPV 2 o 5 veces tuvo un efecto insignificante en la inmunogenia contra hRSV o hPIV3 según lo evaluado por ELISA (**Figura 4A**

y **figura 4B**) y microneutralización (**Figura 4D** y **figura 4E**). Como se analizó anteriormente, la inmunización con una mezcla 1:1:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 dio como resultado una inducción significativamente menor de anticuerpos neutralizantes de hMPV en comparación con el ARNm del hMPV monovalente. Un aumento de 2 veces en la dosis del hMPV (es decir, una mezcla 1:2:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3) aumentó los valores de los anticuerpos neutralizantes a niveles similares (1.4 veces más bajos, $p = 0.708$) a los inducidos por ARNm del hMPV monovalente (**Figura 4F**). El aumento de la dosis del hMPV 5 veces (es decir, una mezcla 1:5:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3) mejoró aún más la inmunogenia, con valores de los anticuerpos de unión 3.7 veces mayores ($p < 0.001$) (**Figura 4C**) y los valores de los anticuerpos neutralizantes 1.4 veces mayores ($p = 0.835$) (**Figura 4F**) en comparación con los 0.5 µg de hMPV monovalente. Los datos de este estudio de mezcla demuestran que un aumento de 5 veces en la dosis del hMPV supera la interferencia sin afectar negativamente la inmunogenia de hRSV o hPIV3.

El efecto de las disminuciones de las dosis del hPIV3 en estudios de mezcla se investigó en grupos de ratones inmunizados con una mezcla 1:1:0.2 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 o un ARNm del hPIV3 monovalente (0.1 µg/dosis de ARNm del hPIV3). Los valores de los anticuerpos inducidos por estos regímenes se compararon con los inducidos por una mezcla 1:1:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 y adicionalmente, solo para hPIV3, con los inducidos por 0.1 µg de ARNm del hPIV3 monovalente. Los datos de este estudio de mezcla demuestran que disminuir la dosis del hPIV3 5 veces no superó la interferencia y no tuvo ningún efecto en la inmunogenia contra hRSV, hMPV o hPIV3 según lo evaluado por ELISA (**Figuras 5A a 5C**) y microneutralización (**Figuras 5D a 5F**).

Los datos de los estudios de mezclas anteriores demuestran que: (1) la interferencia parece deberse a la expresión del ARNm; (2) no se observó interferencia significativa cuando se coadministraron las proteínas recombinantes de hRSV, hMPV y hPIV3; (3) el aumento de la dosis de ARNm del hMPV supera la interferencia sin afectar negativamente la inmunogenia de

hRSV o hPIV3; y (3) la disminución de la dosis de ARNm del hPIV3 no supera la interferencia.

Ejemplo 4: Estudios de coformulación trivalente e inmunogenia del hMPV

El efecto de los aumentos de la dosis del hMPV en los estudios de coformulación también se investigó utilizando las mismas proporciones de hRSV, hMPV y hPIV3 en los estudios de mezcla analizados anteriormente. Las dosis se muestran a continuación en la tabla 2. Las construcciones de ARNm se formularon con LNP OF-02, a menos que se indique de otro modo.

Tabla 2 – Dosis/proporciones de la coformulación de ARNm de hRSV, hMPV y hPIV3 prefusión probados con LNP OF-02

Grupo	Modalidad	Proporción hRSV:hMPV:hPIV3	Dosis (µg)
1	ARNm	1:1:1	0.5, 0.5, 0.5
2	ARNm	1: <u>2</u> :1	0.5, <u>1</u> , 0.5
3	ARNm	1: <u>5</u> :1	0.5, <u>2.5</u> , 0.5
4	ARNm	RSV solo	0.5
5	ARNm	hMPV solo	0.5
6	ARNm	hPIV3 alone	0.5

Para evaluar el efecto de los aumentos de la dosis del hMPV en estudios de coformulación, se inmunizaron grupos de ratones con una coformulación 1:2:1 o 1:5:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3, o con ARNm monovalentes (que contenían 0.5 µg/dosis de ARNm del hRSV prefusión, ARNm del hPIV3 prefusión o ARNm del hMPV prefusión). Los valores de los anticuerpos inducidos por el ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 coformulado se compararon con los inducidos por una coformulación 1:1:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 y los inducidos por los controles monovalentes.

La inmunización de la coformulación 1:1:1 indujo valores de anticuerpos de unión a hRSV y valores de anticuerpos neutralizantes similares en

comparación con la inmunización con RSV monovalente. Ni los aumentos de 2 ni de 5 veces en la dosis del hMPV afectaron significativamente los valores de los anticuerpos contra el RSV (**Figura 6A y figura 6B**). Se observaron resultados similares con los valores de los anticuerpos contra hPIV3, sin diferencias apreciables entre los grupos (**Figura 6C y figura 6D**). Estos datos demuestran que no se observó interferencia para el ARNm del hRSV o del hPIV3 en las coformulaciones y no hubo diferencias significativas en la inducción de valores de anticuerpos de unión al hRSV y al hPIV3 o valores de los anticuerpos neutralizantes.

Con respecto al hMPV, la inmunización de la coformulación 1:1:1 indujo un valor de anticuerpos de unión 4.3 veces menor ($p < 0.001$) (**Figura 6E**) y un valor de anticuerpos neutralizantes 6 veces menor ($p < 0.001$) (**Figura 6F**) en comparación con la inmunización con hMPV monovalente. Un aumento de 2 veces en la dosis del hMPV (es decir, coformulación 1:2:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3) aumentó los valores de los anticuerpos de unión y los valores de los anticuerpos neutralizantes 1.75 veces ($p = 0.0159$) y 1.52 veces ($p = 0.8$), respectivamente, en relación con la coformulación 1:1:1. Sin embargo, ambos se mantuvieron significativamente más bajos que el control monovalente (2.44 veces ($p < 0.001$) y 3.94 veces ($p < 0.001$), respectivamente). El aumento de la dosis del hMPV 5 veces (es decir, coformulación 1:5:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3) aumentó los valores de los anticuerpos de unión y los valores de los anticuerpos neutralizantes 2.57 veces ($p < 0.001$) y 2.53 veces ($p = 0.047$), respectivamente, en relación con la inmunización de coformulación 1:1:1. La diferencia en los valores de los anticuerpos de unión en relación con el hMPV monovalente fue muy leve (1.66 veces, $p = 0.0389$), mientras que la diferencia en los valores de los anticuerpos neutralizantes en relación con el hMPV monovalente no fue estadísticamente diferente (2.37 veces, $p = 0.079$).

Para evaluar más a fondo la presencia de interferencia y el efecto de los aumentos de dosis del hMPV, se formularon estudios de coformulación con LNP cKK-E10. Las dosis utilizadas se muestran a continuación en la tabla 3.

Tabla 3 – Dosis/proporciones de la coformulación de ARNm de hRSV, hMPV y hPIV3 prefusión probados con LNP cKK-E10

	Grupo	Modalidad	Proporción hRSV:hMPV:hPIV3	Dosis (µg)
5	1	ARNm	1: <u>2</u> :1	0.5, <u>1</u> , 0.5
	2	ARNm	1: <u>5</u> :1	0.5, <u>2.5</u> , 0.5
	3	ARNm	RSV solo	0.5
10	4	ARNm	hMPV solo	0.5
	5	ARNm	hPIV3 alone	0.5

Para evaluar el efecto de los aumentos de la dosis del hMPV en estudios de coformulación con LNP cKK-E10, se inmunizaron grupos de ratones con una coformulación 1:2:1 o 1:5:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3, o con ARNm monovalentes (que contenían 0.5 µg/dosis de ARNm del hRSV prefusión, ARNm del hPIV3 prefusión o ARNm del hMPV prefusión). Los valores de los anticuerpos inducidos por el ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 coformulado se compararon a continuación con los inducidos por los controles monovalentes.

La inmunización con las coformulaciones 1:2:1 y 1:5:1 indujo valores de los anticuerpos de unión al hRSV y valores de los anticuerpos neutralizantes similares en comparación con la inmunización con RSV monovalente (**Figura 7A** y **figura 7B**). Se observaron resultados similares con los valores de los anticuerpos contra hPIV3, sin diferencias apreciables entre los grupos (**Figura 7C** y **figura 7D**). Estos datos demuestran que no se observó interferencia para el ARNm del hRSV o del hPIV3 en las coformulaciones con LNP CKK-E10 y no hubo diferencias significativas en la inducción de valores de anticuerpos de unión al hRSV y al hPIV3 o valores de los anticuerpos neutralizantes.

Con respecto al hMPV, la inmunización de la coformulación 1:2:1 indujo un valor de anticuerpos de unión 1.9 veces menor ($p = 0.0027$) (**Figura 7E**) y un valor de anticuerpos neutralizantes 3.9 veces menor ($p < 0.001$) (**Figura 7F**) en comparación con la inmunización con hMPV monovalente. El aumento de la

dosis del hMPV 5 veces (es decir, coformulación 1:5:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3) aumentó los valores de los anticuerpos de unión y los valores de los anticuerpos neutralizantes a niveles similares a los inducidos por hMPV monovalente.

- 5 Los datos de los estudios de coformulación demuestran que un aumento de 5 veces en la dosis del hMPV supera la interferencia sin afectar negativamente la inmunogenia de hRSV o hPIV3. Además, las construcciones de ARNm formuladas con LNP OF-02 y LNP cKK-E10 presentan patrones de interferencia similares con respecto a la coformulación 1:5:1.

10 Ejemplo 5: Estudios de coformulación trivalente con varias LNP e impacto en la inmunogenia

Se evaluó la inmunogenia para coformulaciones trivalentes de hRSV, hMPV y hPIV3 prefusión que se formularon con LNP OF-02, LNP cKK-E10 o LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10. Las dosis/proporciones de hRSV, hMPV y hPIV3 prefusión se muestran a continuación en la tabla 4.

Tabla 4 – Dosis/proporciones de ARNm de hRSV, hMPV y hPIV3 prefusión coformulados probados con LNP OF-02, LNP cKK-E10 o LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10

20	Grupo	Modalidad	Proporción hRSV:hMPV:hPIV3	LNP	Dosis (µg)
	1	ARNm	1:1:1 (Grupo de unión en trehalosa)	OF-02	0.5, 0.5, 0.5
25	2	ARNm	1:1:1	OF-02	0.5, 0.5, 0.5
	3	ARNm	1: <u>3</u> :1	OF-02	0.5, <u>1.5</u> , 0.5
	4	ARNm	RSV solo	OF-02	0.5
30	5	ARNm	hMPV solo	OF-02	0.5
	6	ARNm	hPIV3 alone	OF-02	0.5

5	7	ARNm	1:1:1	cKK-E10	0.5, 0.5, 0.5
	8	ARNm	1: <u>3</u> :1	cKK-E10	0.5, <u>1.5</u> , 0.5
	9	ARNm	RSV solo	cKK-E10	0.5
	10	ARNm	hMPV solo	cKK-E10	0.5
	11	ARNm	hPIV3 alone	cKK-E10	0.5
10	12	ARNm	1:1:1	GL- HEPES- E3-E12- DS-4-E10	0.5, 0.5, 0.5
	13	ARNm	1: <u>3</u> :1	GL- HEPES- E3-E12- DS-4-E10	0.5, <u>1.5</u> , 0.5
	14	ARNm	RSV solo	GL- HEPES- E3-E12- DS-4-E10	0.5
20	15	ARNm	hMPV solo	GL- HEPES- E3-E12- DS-4-E10	0.5
	16	ARNm	hPIV3 alone	GL- HEPES- E3-E12- DS-4-E10	0.5

Para evaluar el efecto en la inmunogenia en las coformulaciones de hRSV, hMPV y hPIV3 prefusión formuladas con LNP OF-02, LNP cKK-E10 o LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10, se inmunizaron grupos de ratones con una coformulación 1:1:1 o 1:3:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3, o con ARNm

monovalentes (que contenían 0.5 µg/dosis de ARNm del hRSV prefusión, ARNm del hPIV3 prefusión o ARNm del hMPV prefusión). A los ratones de los grupos 1 a 6 (Tabla 4) se les administraron dichas construcciones de ARNm formuladas con LNP OF-02. A los ratones de los grupos 7 a 11 se les administraron dichas construcciones de ARNm formuladas con LNP cKK-E10 y a los ratones de los grupos 12 a 16 se les administraron dichas construcciones de ARNm formuladas con LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10. Cada construcción de ARNm se diluyó en PBS excepto el grupo 1 (es decir, el grupo de unión en trehalosa), en el que la construcción de ARNm se diluyó en trehalosa. Los valores de los anticuerpos inducidos por las construcciones de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 coformuladas y analizadas con cada uno de las tres LNP diferentes se compararon con los inducidos por los controles monovalentes.

Las transferencias Western se realizaron en lisados de células transfectadas con la coformulación 1:1:1 y 1:3:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3 y los ARNm monovalentes de hRSV, hMPV y hPIV3 formulados con LNP OF-02, LNP. cKK-E10 o LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 para detectar la expresión de las proteínas de hRSV, hMPV y hPIV3 en cada una de las formulaciones (**Figuras 8A a 8C**). Todas las formulaciones que contenían hRSV fueron positivas para niveles elevados de expresión de proteínas (**Figura 8A**). Todas las formulaciones que contenían hMPV fueron positivas para niveles elevados de expresión de proteínas (**Figura 8B**). Todas las formulaciones que contenían hPIV3 fueron positivas para niveles elevados de expresión de proteínas (**Figura 8C**).

Con respecto al hMPV, la inmunización de la coformulación 1:1:1 con LNP OF-02 indujo un valor de anticuerpos de unión 3.9 veces menor ($p < 0.001$) y un valor de anticuerpos neutralizantes 6.8 veces menor ($p < 0.001$) en comparación con la inmunización con hMPV monovalente (**Figuras 9A y 9B**). Un aumento de 3 veces en la dosis del hMPV (es decir, coformulación 1:3:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3) analizada con LNP OF-02 aumentó los valores de los anticuerpos de unión y los valores de los anticuerpos neutralizantes, pero ambos permanecieron más bajos que los inducidos por el control hMPV monovalente (2 veces menor ($p = 0.0145$) y 2.2 veces menor ($p = 0.0128$) respectivamente). La

inmunización de la coformulación 1:1:1 con LNP cKK-E10 indujo un valor de anticuerpos de unión 2.1 veces menor ($p < 0.008$) y un valor de anticuerpos neutralizantes 1.9 veces menor ($p < 0.0245$) en comparación con la inmunización con hMPV monovalente (**Figuras 9A y 9B**). Un aumento de 3 veces en la dosis del hMPV (es decir, coformulación 1:3:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3) analizada con LNP cKK-E10 aumentó los valores de los anticuerpos de unión y los valores de los anticuerpos neutralizantes a niveles similares a los inducidos por el control hMPV monovalente. La inmunización de la coformulación 1:1:1 con LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 indujo valores de los anticuerpos de unión a hMPV 2 veces más bajos ($p = 0.0147$) y valores de los anticuerpos neutralizantes similares en comparación con la inmunización con hMPV monovalente (**Figuras 9A y 9B**). Por tanto, no se observó interferencia en la inducción de anticuerpos anti-hMPV funcionales. Además, un aumento de 3 veces en la dosis del hMPV (es decir, coformulación 1:3:1 de ARNm de hRSV:hMPV:hPIV3) probada con LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 indujo un valor de anticuerpos de unión 1.8 veces mayor ($p < 0.0395$) y un valor de anticuerpos neutralizantes 4.5 veces mayor ($p < 0.001$) en comparación con la inmunización con hMPV monovalente (**Figuras 9A y 9B**). Además, los datos indican que el hMPV monovalente formulado con LNP OF-02 era más inmunógeno que el hMPV monovalente formulado con cKK-E10 o GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10.

Con respecto al hPIV3, la inmunización con las coformulaciones 1:1:1 y 1:3:1 con LNP cKK-E10 o LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 indujo valores de los anticuerpos de unión al hPIV3 similares y valores de los anticuerpos neutralizantes en comparación con la inmunización con hPIV3 monovalente (**Figuras 9C y 9D**). No se observó interferencia en la inmunogenia de hPIV3 en coformulaciones con LNP cKK-E10 y LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10. Además, no hubo diferencias significativas en la inducción de valores de los anticuerpos de unión al hPIV3 o valores de los anticuerpos neutralizantes con cualquiera de las LNP. La inmunización con coformulaciones 1:1:1 y 1:3:1 con LNP OF-02 indujo valores de los anticuerpos de unión al hPIV3 y valores de los anticuerpos neutralizantes similares en comparación con la inmunización con hPIV3 monovalente.

Con respecto al RSV, el RSV monovalente formulado con LNP cKK-E10 indujo un valor de anticuerpos de unión 1.9 veces menor ($p < 0.0316$) y un valor de anticuerpos neutralizantes 1.8 veces menor (diferencia no estadísticamente significativa) en comparación con la coformulación 1:1:1 con LNP cKK-E10 (Figuras 9E y 9F). Además, el RSV monovalente formulado con LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 fue menos inmunógeno de lo esperado. No se observó interferencia con respecto al hRSV en las coformulaciones 1:1:1 y 1:3:1 con LNP OF-02, LNP cKK-E10 o LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10.

Además, para determinar si PBS tuvo algún impacto en la inmunogenia, se compararon los valores de los anticuerpos neutralizantes para construcciones de ARNm de hRSV, hMPV y hPIV3 diluidos con PBS con los valores de los anticuerpos neutralizantes para construcciones de ARNm de hRSV, hMPV y hPIV3 diluidas con trehalosa. Los resultados indicaron que las construcciones de ARNm diluidas con PBS indujeron valores de los anticuerpos neutralizantes de hRSV, hMPV y hPIV3 similares en comparación con las construcciones de ARNm diluidas con trehalosa (Figura 10). Por tanto, las construcciones de ARNm diluidas en PBS no tuvieron impacto en la inmunogenia en comparación con las construcciones de ARNm diluidas en trehalosa.

Los datos del estudio de coformulación trivalente anterior con LNP OF-02, LNP cKK-E10 y LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 demuestran que: (1) diferentes LNP tienen diferentes efectos en la expresión del ARNm, lo que puede provocar interferencias; (2) no se observó interferencia en la inmunogenia del hMPV en coformulaciones con LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10; (3) se observó una ligera interferencia en la inmunogenia del hMPV en la coformulación 1:1:1 con LNP cKK-E10, pero no se observó interferencia en la coformulación 1:3:1 con LNP cKK-E10; (4) no se observó interferencia en la inmunogenia de hRSV o hPIV3 en coformulaciones con LNP OF-02, LNP cKK-E10 o LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10; y (5) el cambio de trehalosa a PBS como diluyente no afectó la inmunogenia.

30

Ejemplo 6: Estudios de coformulación bivalente con varias LNP e impacto en la inmunogenia

Se evaluó la interferencia en la inmunogenia de hRSV y hMPV para coformulaciones bivalentes 1:1 de hRSV y hMPV prefusión formuladas con LNP IM-001, LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 o LNP OF-02. Además, la inmunogenia de hRSV y hMPV para la coformulación bivalente 1:1 probada con IM-001 se comparó con las coformulaciones bivalentes 1:1 probadas con GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 y OF-02. Las dosis/proporciones de hRSV y hMPV prefusión se muestran a continuación en la tabla 5.

Tabla 5 – Dosis/proporciones de hRSV y hMPV prefusión coformulados probados con LNP IM-001, LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 u OF-02

Grupo	Modalidad	Proporción hRSV:hMPV	LNP	Dosis (µg)
1	ARNm	1:1	OF-02	0.5, 0.5
2	ARNm	1:1	GL- HEPES- E3-E12- DS-4-E10	0.5, 0.5
3	ARNm	1:1	IM-001	0.5, 0.5
4	ARNm	RSV	OF-02	0.5
5	ARNm	RSV	GL- HEPES- E3-E12- DS-4-E10	0.5
6	ARNm	RSV	IM-001	0.5
7	ARNm	hMPV	OF-02	0.5
8	ARNm	hMPV	GL- HEPES-	0.5

			E3-E12- DS-4-E10	
9	ARNm	hMPV	IM-001	0.5

5 Para evaluar la interferencia e inmunogenia de hRSV y hMPV en coformulaciones de hRSV y hMPV prefusión formuladas con LNP IM-001, LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 o LNP OF-02, se inmunizaron los grupos de ratones con una coformulación 1:1 de ARNm de hRSV:hMPV, o con ARNm monovalentes (que contenían 0.5 µg/dosis de ARNm del hRSV prefusión o de ARNm del hPIV3 prefusión). A los ratones de los grupos 1 a 3 (Tabla 5) se les administró una coformulación 1:1 de ARNm de hRSV:hMPV con LNP IM-001, LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 o LNP OF-02. A los ratones de los grupos 4 a 6 se les administró un ARNm del hRSV monovalente con LNP IM-001, LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 o LNP OF-02, y a los ratones de los grupos 7 a 9 se les administró un ARNm del hMPV monovalente con LNP IM-001, LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 o LNP OF-02. Los valores de los anticuerpos inducidos por las construcciones de ARNm de hRSV:hMPV coformuladas y analizadas con cada una de las tres LNP diferentes se compararon entre sí y con los inducidos por los controles monovalentes.

20 No se observó interferencia en la inmunogenia del hRSV en ninguna de las coformulaciones bivalentes 1:1 de hRSV y hMPV prefusión formuladas con LNP IM-001, LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 o LNP OF-02 (**Figuras 11A y 11B**). Además, no se observó interferencia en la inmunogenia del hMPV en las coformulaciones bivalentes 1:1 de hRSV y hMPV prefusión formuladas con LNP IM-001 y LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 (**Figuras 11C y 11D**). Sin embargo, la coformulación bivalente 1:1 probada con OF-02 indujo un valor de anticuerpos de unión 1.9 veces menor ($p < 0.0173$) y un valor de anticuerpos neutralizantes 2.2 veces menor (diferencia no estadísticamente significativa) en comparación con la inmunización con hMPV monovalente (**Figuras 11C y 11D**).

30 Con respecto a la inmunogenia del hRSV, la coformulación bivalente 1:1 probada con LNP IM-001 fue más inmunógeno e indujo un valor de anticuerpos neutralizantes del RSV 2.4 veces mayor en comparación con la coformulación bivalente 1:1 probada con LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 (**Figura 11A**).

Además, la coformulación bivalente 1:1 probada con LNP IM-001 indujo valores de los anticuerpos de unión al hRSV y valores de los anticuerpos neutralizantes similares en comparación con la inmunización con la coformulación bivalente 1:1 probada con LNP OF-02 (**Figuras 11A y 11B**). Además, la coformulación bivalente 1:1 probada con LNP IM-001 fue más inmunógena que el hRSV monovalente, induciendo valores de anticuerpos neutralizantes 2.4 veces más elevados ($p = 0.0047$) y de unión 1.7 veces más elevados ($p = 0.0037$).

Con respecto a la inmunogenia del hMPV, la coformulación bivalente 1:1 probada con LNP IM-001 fue más inmunógeno e indujo un valor de anticuerpos neutralizantes del hMPV 2.8 veces mayor ($p = 0.0211$) en comparación con la coformulación bivalente 1:1 probada con LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10. (**Figura 11C**). Además, la coformulación bivalente 1:1 probada con LNP IM-001 indujo valores de anticuerpos de unión al hMPV y de anticuerpos neutralizantes similares en comparación con la inmunización con la coformulación bivalente 1:1 probada con LNP OF-02 (**Figuras 11C y 11D**). Además, la coformulación bivalente 1:1 probada con LNP IM-001 fue más inmunógena que el hMPV monovalente, induciendo valores de anticuerpos neutralizantes 3.2 veces más elevados ($p < 0.0093$), mientras que la coformulación bivalente 1:1 probada con LNP GL-HEPES -E3-E12-DS-4-E10 indujo valores de anticuerpos neutralizantes 9.5 veces mayores ($p < 0.001$) que el hMPV monovalente probado con LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10.

Los datos de los estudios de coformulación bivalente anteriores con LNP IM-001, LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 y LNP OF-02 demuestran que: (1) no se observó interferencia en la inmunogenia de hRSV o hMPV en coformulaciones bivalentes analizadas con LNP IM-001 o LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10; (2) las coformulaciones bivalentes probadas con IM-001 fueron más inmunógenas que las probadas con LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10; y (3) los valores de los anticuerpos en las coformulaciones 1:1 fueron generalmente más elevados en comparación con los valores de los anticuerpos en los controles monovalentes.

Ejemplo 7: Compatibilidad de la coformulación bivalente de RSV y hMPV administrada con mezcla de hPIV3

Se evaluó la interferencia en la inmunogenia de hRSV, hMPV y hPIV3 cuando se administraron coformulaciones bivalentes de hRSV y hMPV prefusión con una mezcla de hPIV3. Las dosis de hRSV, hMPV y hPIV3 prefusión se muestran a continuación en la tabla 6.

Tabla 6 – Dosis de hRSV y hMPV coformulados bivalentes prefusión y hPIV3 prefusión

Grupo	Modalidad	Construcción	Dosis (µg)
1	ARNm	RSV/hMPV	0.5, 0.5
2	ARNm	RSV/hMPV + hPIV3	0.5, 0.5, 0.5
3	ARNm	hPIV3	0.5

Para evaluar el efecto de la interferencia en la inmunogenia de hRSV, hMPV y hPIV3 en coformulaciones bivalentes de hRSV y hMPV prefusión administradas con una mezcla de hPIV3, se inmunizaron grupos de ratones con una coformulación bivalente 1:1 de hRSV:hMPV, una coformulación bivalente 1:1 de hRSV:hMPV administrada con hPIV3 (que contenía 0.5 µg/dosis de ARNm del hPIV3 prefusión) o hPIV3 monovalente (que contenía 0.5 µg/dosis de ARNm del hPIV3 prefusión) como control. Cada construcción de ARNm se formuló con LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10 y se diluyó en PBS. Los valores de los anticuerpos inducidos por la coformulación bivalente 1:1 de hRSV:hMPV administrada con hPIV3 se compararon con los valores de los anticuerpos inducidos por la coformulación bivalente 1:1 de hRSV:hMPV y los valores de los anticuerpos inducidos por el control de hPIV3 monovalente.

La inmunización con la coformulación bivalente 1:1 de hRSV:hMPV junto con la mezcla de hPIV3 indujo valores de los anticuerpos de unión al hRSV, hMPV y hPIV3 y valores de los anticuerpos neutralizantes similares en comparación con la inmunización con la coformulación bivalente 1:1 de hRSV:hMPV solo y el control de hPIV3 monovalente solo (**Figura 12A** y **figura**

12B). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la unión a hRSV, hMPV y hPIV3 o en los valores de los anticuerpos neutralizantes. Estos datos demuestran que no hubo interferencia en la inmunogenia de hRSV, hMPV o hPIV3 cuando se administraron coformulaciones bivalentes de hRSV:hMPV con una mezcla de hPIV3 con LNP GL-HEPES-E3-E12-DS-4-E10.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

10

15

20

25

30