

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 839 880**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61K 39/155 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2016 PCT/EP2016/066098**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2017 WO17005844**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2016 E 16736161 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2020 EP 3319633**

54 Título: **Vacuna contra el VRS**

30 Prioridad:

07.07.2015 EP 15175647

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.07.2021

73 Titular/es:

**JANSSEN VACCINES & PREVENTION B.V.
(100.0%)
Archimedesweg 4
2333 CN Leiden, NL**

72 Inventor/es:

**LANGEDIJK, JOHANNES, PETRUS, MARIA y
ROYMANS, DIRK, ANDRÉ, EMMY**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 839 880 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra el VRS

Campo de la invención

La invención se refiere al campo de la medicina. Más en particular, la invención se refiere a vacunas contra el VRS.

5 Antecedentes de la invención

Después del descubrimiento del virus respiratorio sincitial (VRS) en los años cincuenta, el virus pronto se convirtió en un patógeno reconocido asociado a infecciones del tracto respiratorio inferior y superior en humanos. En todo el mundo, se estima que cada año se producen 64 millones de infecciones por VRS, lo que provoca 160 000 muertes (Actualización de la OMS sobre infecciones respiratorias agudas, septiembre de 2009). La enfermedad más grave ocurre particularmente en los recién nacidos prematuros, los ancianos y los individuos inmunodeprimidos. En niños menores de 2 años, el VRS es el patógeno más común del tracto respiratorio, que representa aproximadamente el 50% de las hospitalizaciones a causa de infecciones respiratorias, y el valor máximo de hospitalizaciones ocurre a los 2-4 meses de edad. Se ha informado de que hacia los dos años casi todos los niños se han infectado con el VRS. La infección repetida durante la vida se atribuye a la inmunidad natural ineficaz. En los ancianos, la carga de morbilidad por VRS es similar a la causada por las infecciones por gripe A no pandémica.

El VRS es un paramixovirus, perteneciente a la subfamilia de las pneumovirinae. Su genoma codifica varias proteínas, incluidas las proteínas de membrana conocidas como glucoproteína (G) de VRS y proteína de fusión (F) del VRS, las cuales son los principales objetivos antigénicos para los anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos contra la parte mediadora de fusión de la proteína F1 pueden evitar la absorción del virus en la célula y, así, tienen un efecto neutralizante.

Actualmente, no se dispone de una vacuna contra la infección por VRS, pero se desea debido a la carga de morbilidad alta. La glucoproteína de fusión del VRS (F VRS) es un antígeno de vacuna atractivo ya que, tal y como se ha indicado anteriormente, es el principal objetivo de anticuerpos neutralizantes en sueros humanos. Así, un anticuerpo monoclonal neutralizante contra la F VRS (palivizumab) puede evitar la enfermedad grave y se ha aprobado para la profilaxis en recién nacidos.

La F VRS fusiona las membranas víricas y de células anfitrionas al replegar de manera irreversible las proteínas de la conformación lábil prefusión a la conformación estable posfusión. Se han determinado las estructuras de ambas conformaciones para F VRS (McLellan J. S., *et al. Science* 342, 592-598 (2013); McLellan J. S., *et al. Nat Struct Mol Biol* 17, 248-250 (2010); McLellan J. S., *et al. Science* 340, 1113-1117 (2013); Swanson KA, *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 9619-9624 (2011)), así como para las proteínas de fusión de los paramixovirus relacionados y se proporcionó información sobre el mecanismo de esta máquina de fusión compleja. Al igual que otras proteínas de fusión de tipo I, el precursor inactivo, F VRS₀, requiere una escisión durante la maduración intracelular por una proteasa similar a la furina. F VRS contiene dos sitios de furina, lo cual conduce a tres polipéptidos: F2, p27 y F1, el último contiene un péptido de fusión (PF) hidrofóbico en su extremo N. Con el fin de replegar desde la conformación prefusión a la conformación posfusión, la región replegable 1 (RR1) entre el residuo 137 y 216, que incluye el PF y la repetición en héptada A (HRA) tiene que transformarse de un conjunto de hélices, bucles y hebras a una hélice continua larga. El PF, ubicado en el segmento de extremo N de RR1, es entonces capaz de extenderse lejos de la membrana vírica e insertarse en la membrana proximal de la célula diana. A continuación, la región replegable 2 (RR2), la cual forma el tallo del extremo C en la punta F prefusión incluye la repetición en héptada B (HRB), se reubica al otro lado de la cabeza de F VRS y une el trímero superhélice de HRA con el dominio HRB para formar el haz de seis hélices. La formación de superhélice RR1 y la reubicación de RR2 para completar el haz de seis hélices son los cambios estructurales más drásticos que ocurren durante el proceso de replegado.

La mayoría de los anticuerpos neutralizantes en sueros humanos están dirigidos contra la conformación prefusión, pero debido a su inestabilidad la conformación prefusión tiene una propensión a replegarse prematuramente en la conformación posfusión, tanto en la disolución como en la superficie de los viriones. Una proteína F VRS que tiene niveles de expresión altos y mantiene una conformación estable prefusión sería un candidato prometedor para su uso en una subunidad o vacuna vectorial contra el VRS.

Tanto la publicación internacional WO2014/160463 como el documento US2014/271699 describen mutantes D486N de la proteína F VRS.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona métodos para estabilizar la conformación prefusión de un polipéptido F VRS tal y como se define en las reivindicaciones.

Descripción breve de las Figuras

Figura 1: mutaciones de F VRS que estabilizan la conformación prefusión. El porcentaje de mutantes de F VRS expresados en la superficie que permanecen en la conformación prefusión después de un choque térmico a temperaturas crecientes. Los experimentos se realizaron 2-5 veces a diversas concentraciones. Cuando se muestran 5 barras de error, representan las desviaciones estándar de, al menos, dos puntos de entrada de datos de experimentos independientes.

Descripción detallada de la invención

La proteína de fusión (F) del virus respiratorio sincicial (VRS) está implicada en la fusión de la membrana vírica con una membrana de célula anfitriona, la cual es necesaria para la infección. El ARNm de F VRS se traduce en una 10 proteína precursora de 574 aminoácidos denominada F0, la cual contiene una secuencia de péptidos señal en el extremo N (p. ej., residuos de aminoácidos 1-26 de número de identificación de secuencia: 1) que se elimina por una peptidasa señalizadora en el retículo endoplásmico. F0 se escinde en dos sitios (entre los residuos de aminoácidos 109/110 y 136/137) mediante proteasas celulares (en particular furina) en el trans-Golgi y elimina una secuencia corta de intervención glucosilada (también denominada región p27, que comprende los residuos de aminoácidos 110 a 136 15 y genera dos dominios o subunidades designadas F1 y F2. El dominio F1 (residuos de aminoácidos 137-574) contiene un péptido de fusión hidrofóbico en el extremo N y el extremo C contiene la transmembrana (TM) (residuos de aminoácidos 530-550) y la región citoplasmática (residuos de aminoácidos 551-574). El dominio F2 (residuos de aminoácidos 27-109) está covalentemente ligado a F1 por dos puentes disulfuro. Los heterodímeros F1-F2 se montan como homotrímeros en el virión.

20 Actualmente, no se dispone de una vacuna contra la infección por VRS, pero se desea. La mayoría de los anticuerpos neutralizantes en sueros humanos están dirigidos contra la conformación prefusión, pero debido a su inestabilidad la conformación prefusión tiene una propensión a replegarse prematuramente en la conformación posfusión, tanto en la disolución como en la superficie de los viriones.

La presente invención proporciona métodos para estabilizar la conformación prefusión de un polipéptido F VRS, que 25 comprende la introducción de una mutación en la proteína F VRS, en comparación con la proteína natural de F VRS, en donde la mutación es una mutación del aminoácido ácido aspártico (D) en la posición 486 hacia asparagina (N) y en donde las posiciones de aminoácidos se dan en referencia a la secuencia de la proteína F VRS de la cepa A2 (número de identificación de secuencia: 1).

En ciertas realizaciones, el polipéptido F VRS es un polipéptido de VRS disoluble.

30 La presente descripción proporciona adicionalmente composiciones que comprenden una molécula aislada de ácido nucleico que codifica un polipéptido F VRS tal y como se describe en la presente memoria, es decir, que codifica un polipéptido F VRS que comprende, al menos, una mutación en comparación con un polipéptido natural de F VRS, en donde se selecciona la, al menos, una mutación del grupo que consiste en: a) una mutación del aminoácido ácido aspártico (D) en la posición 486 hacia asparagina (N).

35 En ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una proteína F VRS unida a la membrana de longitud completa que se estabiliza en la conformación prefusión. Después de la administración de la composición, la proteína VRS estable de longitud completa expresada a partir de dicha molécula de ácido nucleico se presentará en la membrana celular de las células del sujeto al cual se ha administrado la molécula de ácido nucleico.

En ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido F VRS disoluble.

40 En ciertas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos están optimizadas por codones para la expresión en células de mamíferos, preferiblemente células humanas. Los métodos de optimización por codones son conocidos y se han descrito previamente (p. ej., en la publicación internacional WO 96/09378). Una secuencia se considera optimizada por codones si, al menos, se reemplaza un codón no preferido en comparación con una secuencia natural por un codón que es más preferido. En la presente memoria, un codón no preferido es un 45 codón que se utiliza con menos frecuencia en un organismo que otro codón que codifica el mismo aminoácido, y un codón que es más preferido es un codón que se usa con más frecuencia en un organismo que un codón no preferido. La frecuencia de uso de codón para un organismo específico se puede encontrar en tablas de frecuencia de codón, como puede ser en <http://www.kazusa.or.jp/codon>. Preferiblemente, más de un codón no preferido, preferiblemente la mayoría o todos los codones no preferidos, son reemplazados por codones que son más preferidos. Preferiblemente, 50 los codones utilizados más frecuentemente en un organismo se utilizan en una secuencia optimizada por codones. El reemplazo por codones preferidos generalmente conduce a una expresión más alta.

Un experto en la técnica entenderá que numerosos polinucleótidos y moléculas de ácido nucleico diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del código genético. También se entiende que los 55 expertos en la técnica pueden, con técnicas de rutina, hacer sustituciones de nucleótidos que no afectan a la secuencia de polipéptido codificada por las moléculas de ácido nucleico para reflejar el uso de codón de cualquier organismo anfitrión en particular en el cual se deben expresar los polipéptidos. Por lo tanto, a menos que se especifique lo contrario, una «secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos» incluye todas las secuencias

de nucleótidos que son versiones degeneradas una de la otra y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir o no intrones.

5 Las secuencias de ácidos nucleicos pueden clonarse con técnicas rutinarias de biología molecular, o generarse *de novo* mediante síntesis de ADN, las cuales pueden realizarse con procedimientos rutinarios por parte de empresas de servicios que tienen negocios en el campo de la síntesis de ADN y/o la clonación molecular (p. ej. GeneArt, GenScripts, Invitrogen, Eurofins).

10 En ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico es parte de un vector. Así, la descripción también proporciona composiciones que comprenden un vector que comprende una molécula de ácido nucleico tal y como se ha descrito anteriormente. Los vectores de este tipo pueden ser fácilmente manipulados por métodos bien conocidos para los expertos en la técnica y pueden, por ejemplo, diseñarse para ser capaces de replicación en células procariontas y/o eucariotas. Alternativamente, los vectores están diseñados para no ser capaces de replicación. Los vectores adecuados según la invención son p. ej., adenovectores, incluidos Ad26 o AD35, alfavirus, paramixovirus, virus de la vaccinia, virus del herpes, vectores retrovíricos. etc. El experto en la técnica es capaz de elegir vectores de expresión adecuados e insertar las secuencias de ácido nucleico de la invención de una manera funcional.

15 Según la presente invención, se ha encontrado sorprendentemente que las mutaciones, tal y como se describen en la presente memoria, son capaces de estabilizar la proteína F VRS en la conformación prefusión. Los polipéptidos F VRS que están presentes en las composiciones de la presente descripción comprenden así, al menos, una mutación en comparación con una proteína F VRS natural, en particular en comparación con la proteína F VRS de número de identificación de secuencia: 1.

20 En ciertas realizaciones, los polipéptidos de F VRS estables comprenden la proteína F VRS de longitud completa. Según la invención, la proteína F VRS de longitud completa no está presente dentro de un virión de VRS. Así, la descripción se refiere a los polipéptidos de F VRS expresados recombinantemente.

25 Los polipéptidos de F VRS estables prefusión de la presente descripción se encuentran en la conformación prefusión, es decir, comprenden (muestran), al menos, un epítipo específico de la proteína F de la conformación prefusión. Un epítipo específico de la proteína F de la conformación prefusión es un epítipo que no se presenta en la conformación posfusión. Sin querer vincularse a ninguna teoría particular, se cree que la conformación prefusión de la proteína F VRS puede contener epítopos que son los mismos que aquellos de la proteína F VRS expresada en viriones de VRS naturales y, por lo tanto, puede proporcionar ventajas para la obtención de anticuerpos neutralizantes protectores.

30 En ciertas realizaciones, los polipéptidos comprenden, al menos, un epítipo que es reconocido por un anticuerpo monoclonal específico de prefusión, que comprende una región CDR1 de cadena pesada de número de identificación de secuencia: 4, una región CDR2 de cadena pesada de número de identificación de secuencia: 5, una región CDR3 de cadena pesada de número de identificación de secuencia: 6 y una región CDR1 de cadena ligera de número de identificación de secuencia: 7, una región CDR2 de cadena ligera de número de identificación de secuencia: 8, una región CDR3 de cadena ligera de número de identificación de secuencia: 9 (en lo sucesivo denominada CR9501) y/o un anticuerpo monoclonal específico de prefusión, que comprende una región CDR1 de cadena pesada de número de identificación de secuencia: 10, una región CDR2 de cadena pesada de número de identificación de secuencia: 11, una región CDR3 de cadena pesada de número de identificación de secuencia: 12 y una región CDR1 de cadena ligera de número de identificación de secuencia: 13, una región CDR2 de cadena ligera de número de identificación de secuencia: 14, una región CDR3 de cadena ligera de número de identificación de secuencia: 15 (denominada como CR9502). CR9501 y CR9502 comprenden las regiones variables de cadena pesada y ligera y, así, las especificidades de unión de los anticuerpos 58C5 y 30D8, respectivamente, los cuales anteriormente han demostrado que se unen específicamente a la proteína F VRS en su conformación prefusión y no a la conformación posfusión (véase la publicación internacional WO2012/006596).

45 Según la invención, el polipéptido F VRS prefusión comprende una mutación de residuo de aminoácido ácido aspártico (D) en la posición 486 hacia asparagina (N) (D486N).

Según la presente invención se mostró sorprendentemente que estas mutaciones son capaces de estabilizar la proteína F VRS en la conformación prefusión, en particular cuando la proteína F VRS es la proteína F VRS unida a la membrana de longitud completa.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de F VRS estabilizados son polipéptidos de F VRS disolubles.

50 La presente descripción proporciona composiciones que comprenden polipéptidos de F VRS de prefusión disolubles y estables. En ciertas realizaciones, la proteína F VRS ha sido truncada por la delección de la transmembrana (TM) y la región citoplasmática para crear una proteína F secretada soluble (Fd). Debido a que la región TM es responsable del anclaje y la trimerización de la membrana, la proteína F soluble sin anclaje es considerablemente más lábil que la proteína de longitud completa y se replegará fácilmente hacia el estado final posfusión. Con el fin de obtener la proteína F soluble en la conformación estable prefusión que muestra niveles altos de expresión y estabilidad alta, así, la conformación prefusión necesita estabilizarse. Los polipéptidos de F VRS disolubles que se estabilizan con un dominio de trimerización heteróloga de extremo C y dos mutaciones estabilizadoras en el vértice de la proteína se han descrito en las publicaciones internacionales WO 2014/174018 y WO2014/202570. Se mostró que, en particular, las

mutaciones N67I y S215P eran capaces de estabilizar los polipéptidos de F VRS recombinantes disolubles en la conformación prefusión. Las modificaciones según la presente invención estabilizan adicionalmente las proteínas de F VRS disolubles tal y como se ha descrito en las publicaciones internacionales WO 2014/174018 y WO2014/202570.

5 En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona, así, composiciones que comprenden un polipéptido F VRS de prefusión disoluble, en donde el polipéptido F VRS comprende, al menos, una de las modificaciones tal y como se ha descrito anteriormente en combinación con una mutación de residuo de aminoácido asparagina (N) o treonina (T) en la posición 67 y/o una mutación de residuo de aminoácido serina (S) en la posición 215.

10 En ciertas realizaciones, los polipéptidos de F VRS de prefusión disolubles en las composiciones comprenden, al menos, una de las mutaciones tal y como se describe en la presente memoria en combinación con una mutación del residuo de aminoácido asparagina (N) o treonina (T) en la posición 67 hacia isoleucina (I) (N/T67I) en I, y/o una mutación del residuo de aminoácido serina (S) en la posición 215 hacia prolina (P) (S215P).

15 En ciertas realizaciones, los polipéptidos de F VRS de prefusión disolubles comprenden adicionalmente un dominio de trimerización heterólogo enlazado a un dominio F1 truncado, tal y como se ha descrito en las publicaciones internacionales WO2014/174018 y WO2014/202570. Tal y como se utiliza en la presente memoria, un dominio F1 «truncado» se refiere a un dominio F1 que no es un dominio F1 de longitud completa, es decir, en donde se han eliminado uno o más residuos de aminoácidos de extremo N o extremo C. Según la descripción, al menos el dominio de transmembrana y la cola citoplasmática se han eliminado para permitir la expresión como un ectodominio disoluble.

20 En ciertas realizaciones, el dominio de trimerización comprende el número de identificación de secuencia: 3 y se enlaza con el residuo de aminoácido 513 del dominio F1 de VRS, ya sea directamente o a través de un enlazador. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos SAIG.

25 Se sabe que el VRS existe como un solo serotipo que tiene dos subgrupos antigénicos: A y B. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas F maduras procesadas de los dos grupos son aproximadamente un 93% idénticas. Tal y como se utiliza en toda la presente solicitud, las posiciones de aminoácidos se proporcionan en referencia a la secuencia de la proteína F VRS de la cepa A2 (número de identificación de secuencia: 1). Tal y como se utiliza en la presente invención, la formulación «el aminoácido en la posición “x” de la proteína F VRS quiere decir, así, el aminoácido correspondiente al aminoácido en la posición “x” en la proteína F VRS de la cepa A2 de VRS de número de identificación de secuencia: 1. Obsérvese que en el sistema de numeración utilizado en toda la presente solicitud 1 se refiere al aminoácido del extremo N de una proteína F0 inmadura (número de identificación de secuencia: 1) Cuando se utiliza una cepa de VRS distinta de la cepa A2, las posiciones de aminoácidos de la proteína F deben numerarse con referencia a la numeración de la proteína F de la cepa A2 de número de identificación de secuencia: 1 al alinear las secuencias de la otra cepa de VRS con la proteína F del número de identificación de secuencia: 1 con la inserción de espacios según sea necesario. Las alineaciones de secuencia se pueden realizar con métodos bien conocidos en la técnica, p. ej. por CLUSTALW, Bioedit o CLC Workbench.

35 Un aminoácido según la invención puede ser cualquiera de los veinte que existen de manera natural (o aminoácidos «estándar») o variantes de los mismos, como pueden ser p. ej., D-aminoácidos (los enantiómeros D de aminoácidos con un centro quiral), o cualquier variante que no se encuentre naturalmente en proteínas, como puede ser p. ej., norleucina. Los aminoácidos estándar se pueden dividir en varios grupos en función de sus propiedades. Los factores importantes son la carga, la hidrofiliidad o la hidrofobicidad, la dimensión y los grupos funcionales. Estas propiedades son importantes para la estructura de las proteínas y las interacciones proteína-proteína. Algunos aminoácidos tienen propiedades especiales como puede ser la cisteína, que puede formar enlaces disulfuro covalentes (o puentes disulfuro) a otros residuos de cisteína, prolina que induce giros del eje del polipéptido, y glicina que es más flexible que otros aminoácidos. La Tabla 1 muestra las abreviaturas y propiedades de los aminoácidos estándar.

40 Un experto en la técnica podrá reconocer que pueden hacerse mutaciones a la proteína mediante procedimientos rutinarios de biología molecular. Los polipéptidos F VRS de prefusión en las composiciones son estables, es decir, no cambian fácilmente hacia la conformación posfusión tras procesar los polipéptidos, como puede ser, p. ej., purificación, ciclos de congelación y descongelación y/o almacenamiento, etc.

45 En ciertas realizaciones, los polipéptidos F VRS de prefusión según la invención tienen una estabilidad aumentada cuando se someten al calor, en comparación con los polipéptidos F VRS sin dicha(s) mutación(es). En ciertas realizaciones, los polipéptidos F VRS de prefusión son estables al calor durante, al menos, 10 minutos a una temperatura de 55° C, preferiblemente a 58° C, más preferiblemente a 60° C. Con «calor estable» se hace referencia a que los polipéptidos todavía muestran, al menos, un epítipo específico de prefusión después de haber sido sometidos durante, al menos, 10 minutos a una temperatura aumentada (es decir, una temperatura de 55°C o más), p. ej., según se determine con un método tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1.

50 En ciertas realizaciones, los polipéptidos F VRS se obtienen de una cepa de A de VRS. En ciertas realizaciones, los polipéptidos F VRS se obtienen de la cepa A2 de VRS del número de identificación de secuencia: 1.

55 En ciertas realizaciones, los polipéptidos F VRS se obtienen de una cepa B de VRS. En ciertas realizaciones, los dominios F1 y/o F2 son de la cepa B de VRS del número de identificación de secuencia: 2.

En ciertas realizaciones preferidas, el polipéptido F VRS prefusión de la invención comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el número de identificación de secuencia: 21-26

Tal y como se utiliza en la presente solicitud las secuencias de nucleótidos se proporcionan en dirección de 5' a 3' y las secuencias de aminoácidos desde el extremo N al extremo C, como es habitual en la técnica.

5 En ciertas realizaciones, los polipéptidos según la invención comprenden adicionalmente una secuencia líder, también denominada secuencia señal o péptido señal, que corresponde a los aminoácidos 1-26 del número de identificación de secuencia: 1 o los aminoácidos 1-26 del número de identificación de secuencia: 2. Este es un péptido corto (típicamente 5-30 aminoácidos de largo) presente en extremo N de la mayoría de las proteínas recientemente sintetizadas que están destinadas hacia la vía secretora. En ciertas realizaciones, los polipéptidos según la invención
10 no comprenden una secuencia líder.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos comprenden un marcador de His. Un marcador de His o un marcador de polihistidina es un motivo de aminoácidos en proteínas que consiste en, al menos, cinco residuos de histidina (H), a menudo en el extremo N o C de la proteína, la cual se utiliza generalmente con propósitos de purificación.

15 Tal y como se describe en la presente memoria, la presente invención proporciona métodos para estabilizar la conformación de prefusión de un polipéptido F VRS, es decir, un polipéptido F VRS que muestra un epítipo que está presente en una conformación prefusión de la proteína F VRS, pero que está ausente en la conformación posfusión y/o una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de F VRS de prefusión estable de este tipo.

La descripción proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido F VRS de prefusión, una molécula de ácido nucleico y/o un vector tal y como se describe en la presente memoria y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En el presente contexto, el término «farmacéuticamente aceptable»
20 significa que el portador o excipiente, en las dosis y concentraciones empleadas, no causará ningún efecto no deseado o perjudicial en los sujetos a los cuales se administran. Los portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables de este tipo son bien conocidos en la técnica (véase *Remington's Pharmaceutical Sciences*, edición 18, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*, S. Frokjaer y L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; y *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3ª edición, A. Kibbe, Ed.,
25 Pharmaceutical Press [2000]). Los polipéptidos F VRS, o moléculas de ácido nucleico, se formulan y administran preferiblemente como una disolución estéril, aunque en algunos casos también puede ser posible utilizar preparaciones liofilizadas. Las disoluciones estériles se preparan por filtración estéril o por otros métodos conocidos *per se* en la técnica. A continuación, las disoluciones se liofilizan o se rellenan en recipientes de dosificación farmacéutica. El pH de la disolución generalmente está en el intervalo de pH 3,0 a 9,5, p. ej., pH 5,0 a 7,5. Los polipéptidos F VRS típicamente se encuentran en una disolución que tiene un tampón adecuado farmacéuticamente aceptable y la composición también puede contener una sal. En ciertas realizaciones, los polipéptidos F VRS pueden formularse en una preparación inyectable.

Adicionalmente se proporcionan métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra la proteína F VRS en un sujeto,
35 que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una composición según la invención. También se proporcionan las composiciones según la invención para utilizar en la inducción de una respuesta inmunitaria contra la proteína F VRS en un sujeto, en particular para utilizar como una vacuna. Adicionalmente se proporciona el uso de las composiciones según la invención para la elaboración de un medicamento para el uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra la proteína F VRS en un sujeto. Preferiblemente, la respuesta inmunitaria inducida se caracteriza por anticuerpos neutralizantes contra el VRS y/o inmunidad protectora contra el VRS.
40

En aspectos particulares, la descripción se refiere a un método para inducir anticuerpos neutralizantes de proteína F contra el virus respiratorio sincitial (VRS) en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una composición tal y como se describe en la presente memoria.

La descripción también proporciona un método para reducir la infección y/o la replicación del VRS en, p. ej., el tracto nasal y los pulmones de un sujeto, que comprende la administración al sujeto una composición según la invención.
45 Esto reducirá los efectos adversos resultantes de la infección por el VRS en un sujeto y, así, contribuirá a la protección del sujeto contra los efectos adversos de este tipo tras la administración de la vacuna. En ciertas realizaciones, los efectos adversos de la infección por VRS pueden prevenirse esencialmente, es decir, reducirse a niveles tan bajos que no son clínicamente relevantes.

Las composiciones de la descripción pueden utilizarse para la prevención (profilaxis) y/o el tratamiento de infecciones por VRS. En ciertas realizaciones, la prevención y/o el tratamiento pueden ser dirigidos a grupos de pacientes que son susceptibles de infección por VRS. Los grupos de pacientes de este tipo incluyen, pero no se limitan a, p. ej., los ancianos (p. ej., ≥ 50 años, ≥ 60 años y preferiblemente ≥ 65 años), los jóvenes (p. ej., ≤ 5 años, ≤ 1 año), pacientes hospitalizados y pacientes que se han tratado con un compuesto antivírico, pero han mostrado una respuesta antivírica
50 inadecuada.

Las composiciones según la descripción pueden utilizarse, p. ej., en tratamiento y/o profilaxis independiente de una enfermedad o afección causada por el VRS, o en combinación con otros tratamientos profilácticos y/o terapéuticos, como pueden ser vacunas (existentes o futuras), agentes antivíricos y/o anticuerpos monoclonales.

La descripción proporciona adicionalmente métodos para prevenir y/o tratar la infección por el VRS en un sujeto con las composiciones según la invención. En una realización específica, un método para prevenir y/o tratar la infección por el VRS en un sujeto comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una composición que comprende una cantidad efectiva de un polipéptido F VRS de prefusión, una molécula de ácido nucleico y/o un vector, tal y como se describe en la presente memoria. Una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad de un polipéptido, una molécula de ácido nucleico o un vector que es eficaz para prevenir, mejorar y/o tratar una enfermedad o afección resultante de la infección por el VRS. La prevención comprende inhibir o reducir la propagación del VRS o inhibir o reducir la aparición, el desarrollo o la progresión de uno o más de los síntomas asociados con la infección por VRS. La mejora tal y como se utiliza en la presente memoria puede referirse a la reducción de síntomas visibles o perceptibles de la enfermedad, viremia, o cualquier otra manifestación mensurable de la infección por gripe.

En ciertas realizaciones, las composiciones según la descripción comprenden adicionalmente uno o más adyuvantes. Los adyuvantes son conocidos en la técnica para aumentar adicionalmente la respuesta inmunitaria a un determinante antigénico aplicado. Los términos «adyuvante» y «estimulante inmunitario» se utilizan indistintamente en la presente memoria y se definen como una o más sustancias que causan la estimulación del sistema inmunitario. En este contexto, un adyuvante se utiliza para mejorar una respuesta inmunitaria a los polipéptidos F VRS de la invención. Ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen sales de aluminio como puede ser hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio; composiciones de emulsión de aceite (o composiciones de aceite en agua), incluidas emulsiones de agua-escualeno, como puede ser MF59 (véase p. ej., la publicación internacional WO 90/14837); formulaciones de saponina, como puede ser, p. ej., QS21 y complejos inmunoestimulantes (ISCOMS) (véase p. ej., el documento US 5,057,540; la publicación internacional WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); derivados bacterianos o microbianos, ejemplos de los cuales son el monofosforil lípido A (MPL), MPL 3-O-desacilado (3dMPL), motivo CPG que contiene oligonucleótidos, toxinas bacterianas ADP-ribosilantes o mutantes de los mismos, como puede ser la enterotoxina termolábil LT de *E. coli*, la toxina de cólera CT y similares; proteínas eucariotas (p. ej., anticuerpos o fragmentos de los mismos (p. ej., dirigidos contra el antígeno en sí o CD1a, CD3, CD7, CD80) y ligandos a receptores (p. ej., CD40L, GMCSF, GCSF, etc.), los cuales estimulan la respuesta inmunitaria tras la interacción con las células receptoras. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden aluminio como un adyuvante, p. ej., en la forma de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, fosfato de potasio de aluminio, o combinaciones de los mismos, en concentraciones de 0,05-5 mg, p. ej., de 0,075-1,0 mg, de contenido de aluminio por dosis.

En ciertas realizaciones, las composiciones según la descripción son para uso como vacuna contra el virus respiratorio sincitial (VRS). El término «vacuna» se refiere a una composición que contiene un componente activo eficaz para inducir un cierto grado de inmunidad en un sujeto contra un patógeno o enfermedad determinados, lo cual resultará en, al menos, una disminución (hasta la ausencia completa) de la gravedad, duración u otra manifestación de los síntomas asociados con la infección por el patógeno o la enfermedad. La vacuna comprende una cantidad efectiva de un polipéptido F VRS prefusión y/o una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido F VRS prefusión, y/o un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico, lo cual resulta en una respuesta inmunitaria contra la proteína F del VRS. La vacuna se puede utilizar para prevenir la enfermedad grave del tracto respiratorio inferior que conduce a la hospitalización y para disminuir la frecuencia de complicaciones, como puede ser la neumonía y la bronquiolitis debidas a la infección por VRS y la replicación en un sujeto. En ciertas realizaciones, la vacuna puede ser una vacuna combinada que adicionalmente comprende otros componentes que inducen una respuesta inmunitaria, p. ej., contra otras proteínas del VRS y/o contra otros agentes infecciosos. La administración de componentes activos adicionales puede hacerse, por ejemplo, mediante una administración separada o mediante la administración de productos combinados de las vacunas de la invención y los componentes activos adicionales.

La descripción proporciona adicionalmente un método para vacunar a un sujeto contra el VRS, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición según la invención.

Las composiciones según la descripción pueden administrarse a un sujeto, p. ej., a un sujeto humano. La determinación de la dosis recomendada se llevará a cabo mediante experimentación y es habitual para los expertos en la técnica.

La administración de las composiciones según la descripción puede realizarse con vías estándar de administración. Las realizaciones no limitantes incluyen la administración parenteral, como puede ser la administración intradérmica, intramuscular, subcutánea, transcutánea o mucosa, p. ej., intranasal, oral y similares. En una realización una composición se administra mediante inyección intramuscular. El experto en la técnica conoce las diversas posibilidades de administrar una composición, p. ej., una vacuna con el fin de inducir una respuesta inmunitaria al antígeno o antígenos de la vacuna. En ciertas realizaciones, una composición de la invención se administra intramuscularmente.

Un sujeto tal y como se utiliza en la presente memoria es preferiblemente un mamífero, por ejemplo, un roedor, p. ej., un ratón, una rata algononera, o un primate no humano, o un humano. Preferiblemente, el sujeto es un sujeto humano.

Las composiciones según la descripción pueden administrarse, ya sea como acondicionamiento, o como refuerzo, en un régimen homólogo o heterólogo de acondicionamiento-refuerzo. Si se realiza una vacunación de refuerzo, típicamente, una vacunación de refuerzo de este tipo se administrará al mismo sujeto a la vez entre una semana y un año, preferiblemente entre dos semanas y cuatro meses, después de administrar la composición al sujeto por primera

vez (lo cual, en estos casos, se denomina "primovacunación"). En ciertas realizaciones, la administración comprende una administración de acondicionamiento y, al menos, una administración de refuerzo.

Los polipéptidos F VRS estabilizados de prefusión, obtenibles y/o obtenidos mediante un método de este tipo, también forman parte de la invención, así como los usos de los mismos tal y como se ha descrito anteriormente.

- 5 La invención se explica adicionalmente en los siguientes ejemplos. Los ejemplos no limitan la invención de ninguna manera. Simplemente sirven para aclarar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de polipéptidos F VRS estables de prefusión

- 10 Las moléculas pequeñas terapéuticas que se unen a la proteína F del virus respiratorio sincitial (VRS) inhiben la fusión de la membrana y se unen a un bolsillo simétrico 3 veces mayor dentro de la cavidad central de la conformación prefusión de F VRS metaestable. La unión inhibidora estabiliza esta conformación mediante el anclaje de dos regiones que necesitan someterse a una gran reorganización estructural para facilitar la fusión de membranas. Según la invención sorprendentemente se han identificado mutaciones de escape que paradójicamente estabilizan la conformación prefusión. Según la invención, así, se ha mostrado que las sustituciones de aminoácidos correspondientes a esta clase de mutaciones de escape pueden utilizarse para estabilizar F VRS en la conformación prefusión.

- En la investigación que condujo a la presente invención, un ensayo de activación a partir de la temperatura se desarrolló para evaluar el efecto de mutaciones en la estabilidad de F prefusión. Las células HEK293 que expresaban F VRS natural o F VRS mutante se sometieron a choque térmico de temperaturas altas durante 10 minutos, de modo que se pudiera determinar una curva de fusión. Las mutaciones como puede ser la variante D489Y aumentaron sustancialmente la temperatura necesaria para la activación (Figura 1), lo que indica, así, que las mutaciones estabilizaron el polipéptido F VRS. Las proteínas F VRS de longitud completa (naturales y que comprenden una o más de las mutaciones según las presentes invenciones) se expresaron transitoriamente en las células HEK293T. 48 h después de la transfección, las células se separaron con un tampón que contenía EDTA y se sometieron a choque térmico durante 10 minutos. Las células se tiñeron con anticuerpos conjugados con AlexaFluor647 que eran específicos para F VRS de prefusión (anticuerpo CR9501) o se reconocieron las conformaciones prefusión y posfusión (anticuerpo CR9503, el cual comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo de F VRS Motavizumab). El yoduro de propidio (Invitrogen) se utilizó como tinción live/dead y las células se analizaron mediante citometría de flujo en un instrumento FACS Canto II (BD Biosciences). Los datos se analizaron con el software FlowJo 9.6 y se calcularon las intensidades de fluorescencia medias (IFM), con muestras de choque térmico normalizadas a muestras no tratadas (37 °C).

- Las estructuras fueron sintetizadas y optimizadas por codones en Gene Art (Life Technologies, Carlsbad, CA). Las estructuras se clonaron en pCDNA2004 o se generaron mediante métodos estándar ampliamente conocidos en el campo que involucraban mutagénesis dirigida por el sitio y PCR y secuenciados.

Tabla 1. Aminoácidos estándar, abreviaturas y propiedades

Aminoácido	3 letras	1 letra	Polaridad de la cadena lateral	Carga de cadena lateral (pH 7,4)
alanina	Ala	A	no polar	Neutra
arginina	Arg	R	polar	Positiva
asparagina	Asn	N	polar	Neutra
ácido aspártico	Asp	D	polar	Negativa
cisteína	Cys	C	no polar	Neutra
ácido glutámico	Glu	E	polar	Negativo
glutamina	Gln	Q	polar	Neutra
glicina	Gli	G	no polar	Neutra

ES 2 839 880 T3

Aminoácido	3 letras	1 letra	Polaridad de la cadena lateral	Carga de cadena lateral (pH 7,4)
histidina	His	H	polar	Positiva (10%) neutra (90%)
isoleucina	Ile	I	no polar	Neutra
leucina	Leu	L	no polar	Neutra
lisina	Lys	K	polar	Positiva
metionina	Met	M	no polar	Neutra
fenilalanina	Phe	F	no polar	Neutra
proline	Pro	P	no polar	Neutra
serina	Ser	S	polar	Neutra
treonina	Thr	T	polar	Neutra
triptófano	Trp	W	no polar	Neutra
tirosina	Tyr	Y	polar	Neutra
valina	Val	V	no polar	Neutra

Tabla 2

Ab	Dominio VH	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
CR9501	Aminoácidos 1-125 del número de identificación de secuencia: 16	GASINSDNYWT (número de identificación de secuencia: 4)	HISYTGNTYYTPSLKS (número de identificación de secuencia: 5)	CGAYVLISNCGWFDS (número de identificación de secuencia: 6)
CR9502	Aminoácidos 1-121 del número de identificación de secuencia: 18	GFTFSGHTIA (número de identificación de secuencia: 10)	WVSTNNGNTEYAQKIQQ (número de identificación de secuencia: 11)	EWLVMGGFAFDH (número de identificación de secuencia: 12)

Ab	Dominio VL	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
CR9501	Aminoácidos 1-107 del número de identificación de secuencia: 17	QASQDISTYLN (número de identificación de secuencia: 7)	GASNLET (número de identificación de secuencia: 8)	QQYQYLPYT (número de identificación de secuencia: 9)
CR9502	Aminoácidos 1-110 del número de identificación de secuencia: 19	GANNIGSQNVH (número de identificación de secuencia: 13)	DDRDRPS (número de identificación de secuencia: 14)	QVWDSSRDQAVI (número de identificación de secuencia: 15)

SECUENCIAS

Proteína F VRS A2 secuencia completa (número de identificación de secuencia: 1)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKKKNCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRRELPRFMN
YTLNNAKKTNTVLSKKRKRFLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLS
TNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLE
ITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI
IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTRYVVKQE
GKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDHELLHNVNAVKST
TNIMITTIIIVIIIVLLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIASFN

Proteína F VRS B1 secuencia completa (número de identificación de secuencia: 2)

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIE
LSNIKETKNCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARRREAPQYMN
YTINTTKNLNVSISKRRKRFLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNIKNALLSTN
KAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYINNQLLPVNVQSCRISNIETVIEFQQKNSRLEIN
REFSVNAGVTPPLSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIHK
EEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFF
FPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSL
GAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTRYVVKLEGKN
LYVKGEPIINYYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVNTGKSTTNI
MITTIIIVIIIVLLSLIAIGLLLYCKAKNTPVTLSKDQLSGINNIASFN

5

Número de identificación de secuencia: 3

GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

CR9501 de cadena pesada (número de identificación de secuencia: 16):

QVQLVQSGPGLVKPSQTLALTCNVSGASINSDNYWTWIRQRPGGGLEWIGHISYTG
NTYYTPSLKSRLSMSLETSQSQFSLRLTSVTAADSAVYFCAACGAYVLISNCGWFDS
WGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

10

CR9501 de cadena ligera (número de identificación de secuencia: 17):

EIVMTQSPSSLSASIGDRVITTCQASQDISTYLNWYQQKPGQAPRLLIYGASNLETGVP
SRFTGSGYGTDFSVTISSLQPEDIATYYCQQYQYLPYTFAPGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

CR9502 de cadena pesada (número de identificación de secuencia: 18):

EVQLLQSGAELKKPGASVKISCKTSGFTFSGHTIAWVRQAPGQGLEWMGWVSTNNG
NTEYAQKIQGRVTMTMDTSTSTVYMEIIRSLTSDDTAVYFCAREWLVMGGFAFDHW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC

CR9502 de cadena ligera (número de identificación de secuencia: 19):

QSVLTQASSVSVAPGQTARITCGANNIGSQNVHWYQQKPGQAPVLVVYDDRDRPSG
IPDRFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRDQAVIFGGGKLTVLGQPK
AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSRRSYSCQVTHEGSTVEKTIAPTECS

5 PreF, VRS A2, fibritina (número de identificación de secuencia: 20) (disoluble, natural con fibritina)

MELLILKANAIITLTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNIGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMN
YTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLGVSIAISGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLS
TNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLE
ITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKCLMSNNVQIVRQQSYSIMSI
IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNLTYVVKQE
GKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL_{SAIG}GYIPEAPR
DGQAYVRKDGWVLLSTFL

PreF, VRS A2, fibritina (número de identificación de secuencia: 21) D486N

MELLILKANAIITLTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNIGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMN
YTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLGVSIAISGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLS
TNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLE
ITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKCLMSNNVQIVRQQSYSIMSI
IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNLTYVVKQE
GKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKST
TNIMITTHIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNI_{AFSN}

PreF, VRS A2, fibritina (número de identificación de secuencia: 22) D489Y

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMN
YTLNNAKKTNTVLSKKRKRFLGFLGVSIAISGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLS
TNKAVVSLNSGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLE
ITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI
IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQE
GKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDEFYASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKST
TNIMITTIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLISKDQLSGINNIAFSN

PreF, VRS A2, fibrina (número de identificación de secuencia: 23) S398L, K394R

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMN
YTLNNAKKTNTVLSKKRKRFLGFLGVSIAISGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLS
TNKAVVSLNSGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLE
ITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI
IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCRIMTLKTDVSSS
VITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQ
EGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKS
TTNIMITTIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLISKDQLSGINNIAFSN

PreF disoluble, VRS A2 (número de identificación de secuencia: 24) D486N

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMN
YTLNNAKKTNTVLSKKRKRFLGFLGVSIAISGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLS
TNKAVVSLNSGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLE
ITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI
IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQE
GKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSENEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
SAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

5

PreF disoluble, VRS A2 (número de identificación de secuencia: 25) D489Y

ES 2 839 880 T3

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNRRARRELPRFMN
YTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLS
TNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLL
ITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI
IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQE
GKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFYASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
SAGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

PreF disoluble, VRS A2 (número de identificación de secuencia: 26) S398L, K394R

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNRRARRELPRFMN
YTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLS
TNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLL
ITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI
IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGS
VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCRIMTLKTDVSSS
VITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQE
EGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL
SAGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para estabilizar la conformación prefusión de un polipéptido F VRS, que comprende la introducción de una mutación en la proteína F VRS, en comparación con la proteína natural de F VRS, en donde la mutación es una mutación del aminoácido ácido aspártico (D) en la posición 486 hacia asparagina (N) y en donde las posiciones de aminoácidos se proporcionan en referencia a la secuencia de la proteína F VRS de la cepa A2 (número de identificación de secuencia: 1).
2. Método según la reivindicación 1, en donde el polipéptido F VRS es una proteína de VRS de longitud completa.
3. Método según la reivindicación 1, en donde el polipéptido F VRS es una proteína F VRS soluble.
- 10 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido es estable durante, al menos, 10 minutos a 55° C, preferiblemente a 58° C, más preferiblemente a 60° C.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en el número de identificación de secuencia: 21 y 24.

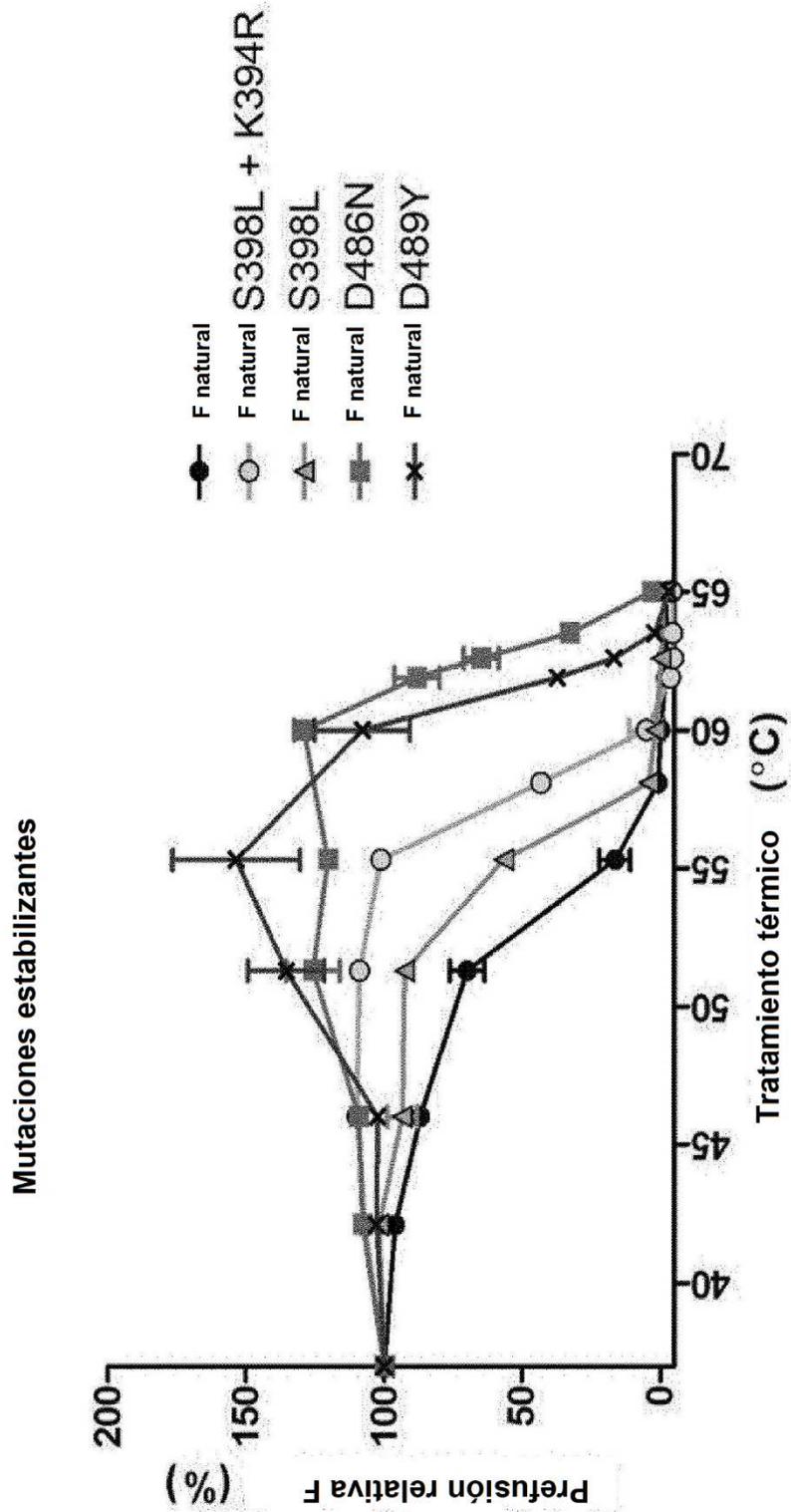


Fig. 1