

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201890235** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2018.05.31

(51) Int. Cl. *A61K 39/155* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2016.07.07

(54) **СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ РАСТВОРИМЫЕ F-ПОЛИПЕПТИДЫ RSV ДО СЛИЯНИЯ**

(31) **15175654.1**

(32) **2015.07.07**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2016/066104**

(87) **WO 2017/005848 2017.01.12**

(71) Заявитель:

**ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:

**Лангедейк Йоханнес, Фурманова
Холленстейн Полина (NL)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к стабильным F-полипептидам респираторного синцитиального вируса (RSV) до слияния, иммуногенным композициям, содержащим указанные полипептиды, и их применениям для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной RSV.

A1

201890235

201890235

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-546980EA/032

СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ РАСТВОРИМЫЕ F-ПОЛИПЕПТИДЫ RSV ДО СЛИЯНИЯ

Настоящее изобретение относится к области медицины. Настоящее изобретение, в частности, относится к рекомбинантному F-полипептиду RSV до слияния и к его применениям, например, в иммуногенных композициях.

Предпосылки изобретения

После открытия респираторно-синцитиального вируса (RSV) в 1950-ых этот вирус быстро стал признанным патогеном, ассоциированным с инфекциями верхних и нижних дыхательных путей у людей. По оценкам в мире ежегодно наблюдается 64 миллионов инфекций RSV, которые приводят к 160000 смертей (WHO Acute Respiratory Infections Update September 2009). Наиболее тяжело заболевание протекает, в частности, у недоношенных детей, пожилых индивидуумов и индивидуумов с ослабленным иммунитетом. У детей моложе 2 лет RSV является наиболее распространенным патогеном дыхательных путей, ответственным приблизительно за 50% госпитализаций вследствие респираторных инфекций, и пик госпитализаций наблюдается в возрасте 2-4 месяца. Сообщалось, что практически все дети к двухлетнему возрасту были инфицированы RSV. Повторные инфекции в течение жизни связаны с малоэффективным врожденным иммунитетом. У пожилых людей вызванное RSV заболевание похоже на заболевания, которые вызваны инфекциями, возбудителем которых является непандемический грипп А.

RSV представляет собой парамиксовирус, принадлежащий к подсемейству pneumoviridae. Его геном кодирует различные белки, в том числе мембранные белки, известные как гликопротеин (G) RSV и белок слияния (F) RSV, которые являются главными антигенными мишенями для нейтрализующих антител. Антитела против опосредующей слияние части белка F1 могут предотвращать поглощение вируса клеткой и, таким образом, обладают нейтрализующим эффектом.

Вакцина против инфекции RSV в настоящее время недоступна, но необходима из-за высокого бремени заболевания. Гликопротеин

слияния RSV (F RSV) является перспективным вакцинным антигеном, поскольку, как указано выше, он является ключевой мишенью для нейтрализующих антител в сыворотке человека. Таким образом, нейтрализующее моноклональное антитело к F RSV (пализумаб) может предупреждать тяжелое течение заболевания и оно было одобрено для профилактики у младенцев.

F RSV подвергает слиянию вирусные мембраны и мембраны клетки-хозяина путем необратимого рефолдинга белка из лабильной конформации до слияния в стабильную конформацию после слияния. Структуры обеих конформаций были определены для F RSV (McLellan JS, et al. *Science* **342**, 592-598 (2013); McLellan JS, et al. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 248-250 (2010); McLellan JS, 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)), а также для белков слияния из родственных парамиксовирусов, обеспечивая возможность более глубокого изучения механизма этого сложного процесса слияния. Подобно другим слитым слияния типа I, для неактивного F₀-предшественника RSV требуется расщепление с помощью фуриноподобной протеазы в процессе внутриклеточного созревания. F RSV содержит два сайта для фурина, которые соответствуют трем полипептидам: F2, p27 и F1, причем последний на своем N-конце содержит гидрофобный пептид слияния (FP). Для рефолдинга из конформации до слияния в конформацию после слияния участок рефолдинга 1 (RR1) между остатком 137 и 216, который включает FP и гептадный повтор A (HRA), подлежит трансформации из сборки спиралей, петель и нитей в длинную непрерывную спираль. FP, расположенный на N-концевом сегменте RR1, в дальнейшем способен вытягиваться от вирусной мембраны и встраиваться в проксимальный участок мембраны целевой клетки. Затем участок рефолдинга 2 (RR2), который формирует C-концевую петлю в шиловидном отростке F до слияния и включает гептадный повтор B (HRB), перемещается на другую сторону головки F RSV и связывает суперспиральный тример HRA с доменом HRB с образованием пучка из шести спиралей. Образование суперспиральной структуры RR1 и перемещение RR2 для завершения образования пучка из шести спиралей представляют

собой наиболее значительные структурные изменения, которые происходят в ходе процесса рефолдинга.

Антитела с наивысшей нейтрализующей активностью в сыворотке человека направлены против конформации до слияния, однако, из-за их нестабильности конформация до слияния обладает склонностью к преждевременному рефолдингу в конформацию после слияния как в жидкой среде, так и на поверхности вирионов. F-белок RSV, который характеризуется как высокими уровнями экспрессии, так и поддержанием стабильной конформации до слияния, будет перспективным кандидатом для применения в субъединичной вакцине или векторной вакцине против RSV.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение представляет стабильные, рекомбинантные полипептиды слияния (F) респираторного синцитиального вируса (RSV) до слияния, т. е. F-полипептиды RSV, которые являются стабильными в конформации до слияния. F-полипептиды RSV по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один эпитоп, который является специфичным к конформации F-белка до слияния. В определенных вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния являются растворимыми полипептидами. Настоящее изобретение также представляет молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие F-полипептиды RSV до слияния согласно настоящему изобретению и векторы, содержащие такие молекулы нуклеиновых кислот.

Настоящее изобретение относится также к композициям, предпочтительно, иммуногенным композициям, содержащим F-полипептид RSV, молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор, а также к их применению в индуцировании иммунного ответа к F-белку RSV, в частности, их применению в качестве вакцины. Настоящее изобретение также относится к способам индуцирования у субъекта иммунного ответа против респираторного синцитиального вируса (RSV), включающий введение субъекту эффективного количества F-полипептида RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей упомянутый F-полипептид RSV и/или вектор, содержащий молекулу упомянутой нуклеиновой кислоты. Предпочтительно, индуцированный иммунный ответ характеризуется выработкой

нейтрализующих антител к RSV и/или защитным иммунитетом против RSV. В конкретных аспектах настоящее изобретение относится к способу индуцирования у субъекта выработки антител к F-белку респираторного синцитиального вируса (RSV), включающий введение субъекту эффективного количества иммуногенной композиции, содержащей F-полипептид RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей упомянутый F-полипептид RSV и/или вектор, содержащий молекулу упомянутой нуклеиновой кислоты.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Очистка белка F(A2) KN66EI I76V L203I S215P. А) Хроматограмма элюирования из катионообменной колонки. Синяя кривая отображает поглощение на 280 нм, коричневая кривая отображает проводимость. Стрелка указывает на собранный пик, который элюировался на 15% этапа элюирования. В) Гель-фильтрационная хроматограмма, полученная с использованием колонки Superdex200, элюата из ионообменной колонки. Синяя кривая отображает поглощение на 280 нм, коричневая кривая отображает проводимость. Стрелки указывают на собранный пик.

Фиг. 2. А) Результаты SDS-PAGE-анализа образца белка F(A2) KN66EI I76V L203I S215P (А) и F(A2) K66E I76V L203I S215P (В), содержащего пик из SEC-хроматограммы, в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Показаны фрагменты F1, F2 в образце в восстанавливающих условиях и F1+F2 в образце в невосстанавливающих условиях. С) Нативный PAGE F(A2) KN66EI I76V S215P с и без L203I и F(A2) K66E I76V L203I S215P. Нативный маркер указывает на относительную электрофоретическую подвижность белка, но его нельзя использовать для определения молекулярной массы белка. Положение бэнда между 242 и 480 кДа соответствует положению тримерного F-белка RSV (обозначен стрелкой). Гели окрашены кумасси бриллиантовым синим.

Фиг. 3. Дополнительная замена Leu 203 на Ile увеличивает стабильность F до слияния в метастабильном F-белке до слияния с заменой S215P. Концентрации F RSV до слияния в супернатантах клеточных культур тестировали в день сбора (72 часа после трансфекции=1-й день) и после хранения в течение 5 и 15 дней при

4°C.

Фиг. 4. Температурная стабильность белков с L203I. Температуру плавления (T_m) определяли в очищенных образцах белков с помощью DSF.

Фиг. 5. Результаты SDS-PAGE-анализа очищенных F-белков, содержащих мутацию L203I, в восстанавливающих (R) и невосстанавливающих (NR) условиях. Показаны фрагменты F1, F2 в образце в восстанавливающих условиях и F1+F2 в образце в невосстанавливающих условиях. Гель был окрашен кумасси бриллиантовым синим.

Фиг. 6. Результаты SEC-MALS-анализа очищенных F-белков, включающих мутацию L203I: А: F(A2)-KN66E-I76V-I203L-S215P-D486N; В: F(A2)-K66E-I76V-I203L-S215P-D486N.

Подробное описание изобретения

Белок слияния (F) респираторного синцитиального вируса (RSV) участвует в слиянии вирусной мембраны с мембраной клетки-хозяина, которая требуется для инфицирования вирусом. МРНК F-белка RSV транслируется в белок-предшественник из 574 аминокислот, обозначенный F0, который содержит последовательность сигнального пептида на N-конце (например, аминокислотные остатки 1-26 с SEQ ID NO: 13), которая удаляется сигнальной пептидазой в эндоплазматическом ретикулуме. F0 расщепляется по двум сайтам (между аминокислотными остатками 109/110 и 136/137) клеточной протеазой (в частности, фурином или фуриноподобной протеазой), удаляющей короткую гликозилированную вставочную последовательность (также известную как участок p27, содержащий аминокислотные остатки 110-136 и образующую два домена или две субъединицы, обозначаемые F1 и F2). Домен F1 (аминокислотные остатки 137-574) содержит гидрофобный пептид слияния на своем N-конце, и C-конец содержит трансмембранный (TM) (аминокислотные остатки 530-550) и цитоплазматический участок (аминокислотные остатки 551-574). Домен F2 (аминокислотные остатки 27-109) ковалентно связан с F1 двумя дисульфидными мостиками. Гетеродимеры F1-F2 подвергаются сборке в вирионе в виде гомотримеров.

Вакцина против инфекции RSV в настоящее время не существует, хотя и является очень желательной. Одним потенциальным подходом к получению вакцины является субъединичная вакцина на основе очищенного F-белка RSV. Однако, для этого подхода желательно, чтобы очищенный F-белок RSV находился в конформации, которая подобна конформации F-белка RSV в состоянии до слияния, который стабилен в течение продолжительного периода, и может быть получен в достаточных количествах. Кроме того, для вакцины на основе растворимой субъединицы необходимо осуществить укорочение F-белка RSV путем делеции трансмембранного (TM) и цитоплазматического участка с получением растворимого секретируемого F-белка (sF). Поскольку участок TM отвечает за заякоривание в мембране и тримеризацию, незаякоренный растворимый F-белок является в значительной степени более лабильным, чем белок полной длины, и будет с легкостью подвергаться рефолдингу в конечное состояние после слияния. Для получения растворимого F-белка в стабильной конформации до слияния, который демонстрирует высокие уровни экспрессии и высокую стабильность, необходимо, таким образом, стабилизировать конформацию до слияния. Также поскольку полноразмерный (мембраносвязанный) F-белок RSV является метастабильным, стабилизация конформации до слияния также необходима для любого подхода по созданию живых аттенуированных вакцин или векторных вакцин.

Для стабилизации растворимого F-белка RSV, который расщепляется на субъединицу F1 и F2 в конформации до слияния, производили слияние фибритинового домена тримеризации с C-концом растворимого F-белка RSV (McLellan et al., *Nature Struct. Biol.* 17: 2-248-250 (2010); McLellan et al., *Science* 340(6136):1113-7 (2013)). Этот домен фибритина или 'Foldon' получен из фибритина T4 и описан ранее в качестве искусственного встречающегося в природе домена тримеризации (Letarov et al., *Biochemistry Moscow* 64: 817-823 (1993); S-Guthe et al., *J. Mol. Biol.* 337: 905-915. (2004)). Однако домен тримеризации не приводит к получению стабильного белка RSV-F до слияния. Более

того, эти усилия даже не привели к получению кандидатов, пригодных для испытания у людей.

Недавно нами были описаны комбинации из нескольких мутаций, которые способны стабилизировать конформацию F-белка RSV до слияния (WO2014/174018 и WO2014/202570). Таким образом, были описаны стабильные F-полипептиды RSV до слияния, содержащие мутацию аминокислотного остатка в положении 67 и/или мутацию аминокислотного остатка в положении 215, предпочтительно мутацию аминокислотного остатка N/T в положении 67 в I и/или мутацию аминокислотного остатка S в положении 215 в P. Кроме того, были описаны растворимые F-полипептиды RSV до слияния, содержащие усеченный домен F1 и по меньшей мере одну стабилизирующую мутацию в домене F1 и/или F2 по сравнению с доменом F1 и/или F2 RSV в F-белке RSV дикого типа, где полипептид содержит гетерологичный домен тримеризации, связанный с усеченным доменом F1. Также дополнительно описаны F-полипептиды RSV до слияния, где полипептиды содержат по меньшей мере одну дополнительную мутацию, где указанная мутация выбрана из группы, состоящей из:

- (a) мутации аминокислотного остатка в положении 46;
- (b) мутации аминокислотного остатка в положении 77;
- (c) мутации аминокислотного остатка в положении 80;
- (d) мутации аминокислотного остатка в положении 92;
- (e) мутации аминокислотного остатка в положении 175;
- (f) мутации аминокислотного остатка в положении 184;
- (g) мутации аминокислотного остатка в положении 185;
- (h) мутации аминокислотного остатка в положении 201;
- (i) мутации аминокислотного остатка в положении 209;
- (j) мутации аминокислотного остатка в положении 421;
- (k) мутации аминокислотного остатка в положении 426;
- (l) мутации аминокислотного остатка в положении 465;
- (m) мутации аминокислотного остатка в положении 486;
- (n) мутации аминокислотного остатка в положении 487 и
- (o) мутации аминокислотного остатка в положении 508.

Предпочтительно, по меньшей мере одна дополнительная мутация выбрана из группы, состоящей из:

- (a) мутации аминокислотного остатка S в положении 46 в G;

- (b) мутации аминокислотного остатка К в положении 77 в Е;
- (c) мутации аминокислотного остатка К в положении 80 в Е;
- (d) мутации аминокислотного остатка Е в положении 92 в D;
- (e) мутации аминокислотного остатка N в положении 175 в Р;
- (f) мутации аминокислотного остатка G в положении 184 в N;
- (g) мутации аминокислотного остатка V в положении 185 в N;
- (h) мутации аминокислотного остатка К в положении 201 в Q;
- (i) мутации аминокислотного остатка К в положении 209 в Q;
- (j) мутации аминокислотного остатка К в положении 421 в N;
- (k) мутации аминокислотного остатка N в положении 426 в S;
- (l) мутации аминокислотного остатка К в положении 465 в Е

или Q;

- (m) мутации аминокислотного остатка D в положении 486 в N;
- (n) мутации аминокислотного остатка Е в положении 487 в Q,

N или I и

- (o) мутации аминокислотного остатка К в положении 508 в Е.

Если была внесена только одна из этих мутаций (в частности, мутация S215P), то был получен метастабильный белок, который можно было применять для оценки стабилизирующего эффекта альтернативных замен.

В соответствии с настоящим изобретением было обнаружено, что мутация аминокислотного остатка L в положении 203 в I дополнительно стабилизирует белок в конформации до слияния.

Таким образом, настоящее изобретение предусматривает рекомбинантные F-полипептиды до слияния, содержащие мутацию аминокислотного остатка L в положении 203 в I.

Настоящее изобретение, в частности, предусматривает рекомбинантные полипептиды слияния (F) респираторно-синцитиального вируса (RSV) до слияния, где полипептид содержит по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две стабилизирующие мутации в домене F1 и/или F2 по сравнению с доменом F1 и/или F2 RSV в F-белке RSV дикого типа, где по меньшей мере одна из стабилизирующих мутаций представляет собой мутацию аминокислотного остатка L в положении 203 в I.

Дополнительно настоящее изобретение предусматривает рекомбинантные F-полипептиды до слияния, содержащие мутацию

аминокислоты S в положении 215 в Р (S215P) и мутацию аминокислотного остатка L в положении 203 в I.

Таким образом, настоящее изобретение далее предусматривает новую стабилизирующую мутацию для получения стабильных рекомбинантных F-полипептидов RSV до слияния, т. е. F-полипептидов RSV, которые являются стабилизированными в конформации до слияния. Стабильные F-полипептиды RSV до слияния по настоящему изобретению находятся в конформации до слияния, т. е. они содержат (демонстрируют) по меньшей мере один эпитоп, который является специфичным к конформации F-белка до слияния. Эпитоп, который является специфичным к конформации F-белка до слияния, представляет собой эпитоп, который не представлен в конформации после слияния. Не ограничиваясь конкретной теорией, полагают, что конформация F-белка RSV до слияния может содержать эпитопы, которые являются такими же, как эпитопы на F-белке RSV, экспрессируемые на встречающихся в природе вирионах RSV, и таким образом, может предоставлять преимущества для активизации защитных нейтрализующих антител.

В определенных вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один эпитоп, который распознается специфическим моноклональным антителом до слияния, содержащим CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1, CDR2-участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, CDR3-участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 3 и CDR1-участок легкой цепи SEQ ID NO: 4, CDR2-участок легкой цепи SEQ ID NO: 5 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 6 (далее в этом документе упоминаемый как CR9501), и/или специфическим моноклональным антителом до слияния, содержащим CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, CDR2-участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 8, CDR3-участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 9 и CDR1-участок легкой цепи SEQ ID NO: 10, CDR2-участок легкой цепи SEQ ID NO: 11 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 12 (упоминаемый как CR9502). CR9501 и CR9502 содержат переменные участки тяжелой и легкой цепи, и таким образом, связывающие специфичности антител 58C5 и 30D8, соответственно, которые, как было показано ранее, специфично связываются с F-белком RSV в его конформации до слияния, но не в конформации

после слияния (смотри WO2012/006596).

В определенных вариантах осуществления рекомбинантные F-полипептиды RSV до слияния содержат по меньшей мере один эпитоп, который распознается по меньшей мере одним специфическим моноклональным антителом до слияния, как описано выше, и полипептиды являются тримерными. В некоторых вариантах осуществления стабильные F-полипептиды RSV до слияния являются растворимыми и содержат усеченный домен F1.

Известно, что RSV существуют в виде одного серотипа, имеющего две антигенные подгруппы: А и В. Аминокислотные последовательности зрелых процессированных F-белков двух групп являются идентичными на приблизительно 93%. Как используется во всей настоящей заявке, положения аминокислот приведены в отношении к последовательности F-белка RSV из штамма А2 (SEQ ID NO: 13). Как используется в настоящем изобретении, выражение "аминокислота в положении "x" F-белка RSV, таким образом, означает аминокислоту, соответствующую аминокислоте в положении "x" в F-белке RSV штамма А2 RSV с SEQ ID NO: 13. Необходимо отметить, что в системе нумерации, используемой в настоящей заявке, 1 относится к N-концевой аминокислоте незрелого F0-белка (SEQ ID NO: 13). При использовании штамма RSV, отличного от штамма А2, положения аминокислот F-белка следует нумеровать по отношению к нумерации F-белка штамма А2 SEQ ID NO: 1 с помощью выравнивания последовательностей другого штамма RSV с F-белком с SEQ ID NO: 13 со вставкой гэпов, при необходимости. Выравнивание последовательностей можно выполнять с помощью способов, хорошо известных в данной области, например, с помощью CLUSTALW, Bioedit или CLC Workbench.

Аминокислота в соответствии с настоящим изобретением может быть любой из двадцати встречающихся в природе (или 'стандартных' аминокислот) или их вариантов, таких как, например, D-аминокислоты (D-энантиомеры аминокислот с хиральным центром), или любым вариантом, которые не встречаются в природе в белках, таких как норлейцин. Стандартные аминокислоты можно разделить на несколько групп, исходя из их свойств. Важными факторами

являются заряд, гидрофильность или гидрофобность, размер и функциональные группы. Эти свойства являются важными для структуры белков и белок-белковых взаимодействий. Некоторые аминокислоты обладают специфическими свойствами, такие как цистеин, который может образовывать ковалентные дисульфидные связи (или дисульфидные мостики) с другими цистеиновыми остатками, пролин, который индуцирует повороты полипептидного остова, и глицин, который является более гибким, чем другие аминокислоты. В таблице 1 приведены сокращения и свойства стандартных аминокислот.

Опытному специалисту следует принять во внимание, что мутации можно осуществлять с белком при помощи стандартных методик молекулярной биологии. Результатом мутаций в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно является повышенные уровни экспрессии и/или повышенные стабилизации F-полипептидов RSV до слияния по сравнению с F-полипептидами RSV, которые не содержат данную (данные) мутацию (мутации).

В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния являются растворимыми.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния содержат усеченный домен F1, где полипептид содержит по меньшей мере одну стабилизирующую мутацию в домене F1 и/или F2 по сравнению с доменом F1 и/или F2 RSV в F-белке RSV дикого типа. В некоторых вариантах осуществления растворимые F-полипептиды RSV до слияния дополнительно содержат гетерологичный домен тримеризации, связанный с упомянутым усеченным доменом F1. В соответствии с настоящим изобретением было показано, что путем связывания гетерологичного домена тримеризации с С-концевым аминокислотным остатком усеченного домена F1, объединенного со стабилизирующей (стабилизирующими) мутацией (мутациями), получают F-полипептиды RSV, которые характеризуются высокой экспрессией и которые связываются с антителами, специфичными к конформации до слияния, что указывает на то, что полипептиды находятся в конформации до слияния. Кроме того, F-полипептиды RSV стабилизированы в конформации до слияния, т. е. даже после процессинга полипептидов они по-

прежнему связаны со специфичными антителами CR9501 и/или CR9502 до слияния, указывая, что специфический эпитоп до слияния сохраняется.

В определенных вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния содержат по меньшей мере три мутации (по сравнению с F-белком RSV дикого типа).

В определенных вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния содержат по меньшей мере одну дополнительную мутацию, выбранную из группы, состоящей из:

- (a) мутации аминокислотного остатка в положении 46;
- (b) мутации аминокислотного остатка в положении 67;
- (c) мутации аминокислотного остатка в положении 83;
- (d) мутации аминокислотного остатка в положении 92;
- (e) мутации аминокислотного остатка в положении 184;
- (f) мутации аминокислотного остатка в положении 207;
- (g) мутации аминокислотного остатка в положении 486 и
- (h) мутации аминокислотного остатка в положении 487.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная мутация выбрана из группы, состоящей из:

- (a) мутации аминокислотного остатка S в положении 46 в G;
- (b) мутации аминокислотного остатка N/T в положении 67 в I;
- (c) мутации аминокислотного остатка L в положении 83 в M;
- (d) мутации аминокислотного остатка E в положении 92 в D;
- (e) мутации аминокислотного остатка G в положении 184 в N;
- (f) мутации аминокислотного остатка V в положении 207 в I;
- (g) мутации аминокислотного остатка D в положении 486 в N и
- (h) мутации аминокислотного остатка E в положении 487 в Q,

N или I.

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат по меньшей мере две мутации.

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат по меньшей мере три мутации.

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат по меньшей мере четыре, пять или шесть мутаций.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный домен тримеризации содержит аминокислотную последовательность

GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 14).

Как описано выше, в некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат усеченный домен F1. Как используется в данном документе, "усеченный" домен F1 относится к домену F1, который не является доменом F1 полной длины, т. е. где на N-конце или C-конце один или несколько аминокислотных остатков были удалены. В соответствии с настоящим изобретением по меньшей мере трансмембранный домен и цитоплазматический хвост были удалены для обеспечения экспрессии продукта в виде растворимого эктодомена.

В некоторых других вариантах осуществления домен тримеризации связан с аминокислотным остатком 513 домена F1 RSV. В некоторых вариантах осуществления домен тримеризации содержит SEQ ID NO: 14 и связан с аминокислотным остатком 513 домена F1 RSV.

В некоторых вариантах осуществления домен F1 и/или домен F происходят из штамма A RSV. В некоторых вариантах осуществления домен F1 и/или F2 происходят из штамма A2 RSV с SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления домен F1 и/или домен F происходят из штамма B RSV. В некоторых вариантах осуществления домен F1 и/или F2 происходят из штамма B RSV SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления домен F1 и/или домен F происходят из штамма CL57-v244 RSV. В некоторых вариантах осуществления домен F1 и/или F2 происходят из штамма CL57-v244 RSV SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления домен F1 и/или F2 происходят из одного штамма RSV. В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния являются химерными полипептидами, т. е. содержат домены F1 и F2, которые происходят из разных штаммов RSV.

В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии F-

полипептидов RSV до слияния по настоящему изобретению увеличен по сравнению с F-полипептидом RSV дикого типа. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии повышен по меньшей мере в 5 раз, предпочтительно до 10 раз. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии повышен более чем в 10 раз.

F-полипептиды RSV до слияния в соответствии с настоящим изобретением являются стабильными, т. е. не изменяются с легкостью в конформацию после слияния при процессинге полипептидов, таком как, например, очистка, циклы замораживания-оттаивания и/или хранение и т. д.

В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния в соответствии с настоящим изобретением имеют повышенную стабильность при хранении при 4°C по сравнению с F-полипептидом RSV без мутации (мутаций). В некоторых вариантах осуществления полипептиды являются стабильными при хранении при 4°C в течение по меньшей мере 30 дней, предпочтительно по меньшей мере 60 дней, предпочтительно по меньшей мере 6 месяцев, даже более предпочтительно по меньшей мере 1 года. Под "стабильными при хранении" подразумевается, что полипептиды по-прежнему демонстрируют по меньшей мере один эпитоп, который является специфичным для специфического антитела до слияния (например, CR9501) при хранении полипептида в растворе (например, среде для культивирования) при 4°C в течение по меньшей мере 30 дней, например, как определено с помощью способа, описанного в примере 7 или 9. В некоторых вариантах осуществления полипептиды демонстрируют по меньшей мере один специфичный эпитоп до слияния в течение по меньшей мере 6 месяцев, предпочтительно в течение по меньшей мере 1 года при хранении F-полипептидов RSV до слияния при 4°C.

В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV в соответствии с настоящим изобретением обладают повышенной стабильностью при воздействии теплом по сравнению с F-полипептидами RSV без указанной (указанных) мутации (мутаций). В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды REV до слияния термостабильны по меньшей мере 30 минут при температуре 55°C,

предпочтительно при 58°C, более предпочтительно при 60°C. «Термостабильный» означает, что полипептиды по-прежнему демонстрируют по меньшей мере один эпитоп, специфичный для конформации до слияния, после того, как их подвергали действию по меньшей мере 30 минут повышенной температуры (например, температуры 55°C или выше), например, как определено с использованием способа, описанного в Примере 6.

В определенных вариантах осуществления полипептиды демонстрируют по меньшей мере один специфичный эпитоп до слияния после воздействия от 1 до 6 циклов замораживания-размораживания в подходящей буферной смеси.

Как используется во всей настоящей заявке, нуклеотидные последовательности представлены в направлении от 5' до 3', и аминокислотные последовательности от N-конца к C-концу, как принято в данной области.

В некоторых вариантах осуществления кодируемые полипептиды в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержат лидерную последовательность, также называемую как сигнальная последовательность или сигнальный пептид, соответствующую аминокислотам 1-26 в SEQ ID NO: 13. Она представляет собой короткий (длиной как правило, 5-30 аминокислот) пептид, присутствующий на N-конце большинства вновь синтезируемых белков, которые предназначены для поступления в секреторный путь. В некоторых вариантах осуществления полипептиды в соответствии с настоящим изобретением не содержат лидерную последовательность.

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат HIS-метку. His-метка или полигистидиновая метка представляет собой аминокислотный мотив в белках, который состоит по меньшей мере из пяти остатков гистидина (H), зачастую на N- или C-конце белка, который обычно используют с целью очистки.

Настоящее изобретение дополнительно представляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей F-полипептиды RSV в соответствии с настоящим изобретением.

В предпочтительных вариантах осуществления молекулы

нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды в соответствии с настоящим изобретением, являются оптимизированными по кодонам для экспрессии в клетках млекопитающих, предпочтительно клетках человека. Способы оптимизации по кодонам известны или были описаны ранее (например, WO 96/09378). Последовательность считается оптимизированной по кодонам, если по меньшей мере один кодон, не являющийся предпочтительным, по сравнению с последовательностью дикого типа замещен кодоном, который является более предпочтительным. В данном документе кодон, не являющийся предпочтительным, представляет собой кодон, который используется менее часто в организме, чем другой кодон, кодирующий такую же аминокислоту, и кодон, являющийся более предпочтительным, представляет собой кодон, который используется более часто в организме, чем кодон, не являющийся предпочтительным. Частоту использования кодонов для конкретного организма можно найти в таблицах частоты использования кодонов, таких как на сайте <http://www.kazusa.or.jp/codon>. Предпочтительно более одного кодона, не являющегося предпочтительным, предпочтительно большинство или все кодоны, не являющиеся предпочтительными, замещают кодонами, которые являются более предпочтительными. Предпочтительно наиболее часто используемые кодоны в организме используют в кодон-оптимизированной последовательности. Как правило, замещение предпочтительными кодонами приводит к более высокой экспрессии.

Специалисту в данной области будет понятно, что несколько различных молекул полинуклеотидов и нуклеиновых кислот могут кодировать один и тот же полипептид в результате вырожденности генетического кода. Также понятно, что специалисты в данной области могут при помощи традиционных методик проводить нуклеотидные замены, которые не влияют на последовательность полипептида, кодируемую молекулами нуклеиновых кислот, для отражения частоты использования кодонов любым конкретным организмом-хозяином, в котором полипептиды будут экспрессироваться. Следовательно, если конкретно не указано иное, то "нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность" включает все нуклеотидные

последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности, которые кодируют белки и РНК могут включать в себя или могут не включать в себя интроны.

Последовательности нуклеиновых кислот можно клонировать с помощью стандартных методик молекулярной биологии или получать *de novo* путем синтеза ДНК, который можно осуществлять с помощью стандартных процедур с участием компаний, предоставляющих услуги в области синтеза ДНК и/или молекулярного клонирования (например, GeneArt, GenScripts, Invitrogen, Eurofins).

Настоящее изобретение также представляет векторы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, как описано выше. Таким образом, в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением является частью вектора. С такими векторами можно легко производить манипуляции с помощью способов, хорошо известных специалисту в данной области техники, и их, например, можно разработать так, чтобы они были способны к репликации в прокариотических и/или эукариотических клетках. Кроме того, многие векторы можно использовать для трансформации эукариотических клеток, и они будут интегрироваться целиком или частично в геном таких клеток, что приведет в результате к стабильным клеткам-хозяевам, содержащим в их геноме необходимую нуклеиновую кислоту. Применяемый вектор может представлять собой любой вектор, который подходит для клонирования ДНК и который можно применять для транскрипции нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. Подходящими векторами в соответствии с настоящим изобретением являются, например, аденовекторы, альфавирус, парамиксовирус, вирус осповакцины, вирус герпеса, ретровирусные векторы и т. д. Специалист в данной области может выбрать подходящие векторы экспрессии и вставить последовательности нуклеиновых кислот по настоящему изобретению функциональным образом.

Клетки-хозяева, содержащие молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие F-полипептиды RSV до слияния, также образуют часть

настоящего изобретения. F-полипептиды RSV до слияния можно получить с помощью технологии рекомбинантной ДНК, включающей экспрессию молекул в клетках-хозяевах, например, клетках яичников китайского хомячка (CHO), линиях опухолевых клеток, клетках ВНК, клеточных линиях человека, таких как клетки HEK293, клетки PER.C6 или клетках дрожжей, грибов, насекомых и т. п. или трансгенных животных, или растений. В некоторых вариантах осуществления клетки происходят из многоклеточного организма, в некоторых вариантах осуществления они происходят из позвоночных или беспозвоночных. В некоторых вариантах осуществления клетками являются клетки млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления клетками являются клетки человека. В целом получение рекомбинантных белков, таких как F-полипептиды RSV до слияния по настоящему изобретению, в клетке-хозяине предусматривает введение гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид в экспрессируемом формате, в клетку-хозяина, культивирование клеток в условиях, способствующих экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты и обеспечение экспрессии полипептида в указанной клетке. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок в экспрессируемом формате, может находиться в форме кассеты экспрессии и обычно требует последовательностей, способствующих экспрессии нуклеиновой кислоты, таких как энхансер(ы), промотор, сигнал полиаденилирования и т.п. Специалист в данной области осведомлен о том, что для достижения экспрессии гена в клетках-хозяевах можно использовать различные промоторы. Промоторы могут быть конститутивными или регулируемыми, и их можно получить из разных источников, в том числе вирусов, прокариотических или эукариотических источников, или разрабатывать искусственным путем.

Среды для культивирования клеток доступны от различных поставщиков, и подходящую среду можно стандартно выбрать для клетки-хозяина для экспрессии белка, представляющего интерес, в данном случае F-полипептидов RSV до слияния. Подходящая среда может содержать или может не содержать сыворотку.

"Гетерологичной молекулой нуклеиновой кислоты" (также называемой в данном документе как 'трансген') является молекула нуклеиновой кислоты, которая в природе не присутствует в клетке-хозяине. Ее вводят, например, в вектор с помощью стандартных методик молекулярной биологии. Трансген обычно функционально связан с последовательностями, контролирующими экспрессию. Это можно выполнить, например, путем помещения нуклеиновой кислоты, кодирующей трансген(трансгены), под контроль промотора. Можно добавлять дополнительные регуляторные последовательности. Многие промоторы можно использовать для экспрессии трансгена(трансгенов), и они известны специалисту, например, такие промоторы могут включать промоторы вирусов, млекопитающих, синтетические промоторы и т. п. Неограничивающим примером подходящего промотора для получения экспрессии в эукариотических клетках является промотор CMV (патент США № 5385839), например предранний промотор CMV, например, содержащий нуклеотиды от -735 до +95 из энхансера/промотора предраннего гена CMV. Сигнал полиаденилирования, например сигнал полиА гена бычьего гормона роста (US 5122458), может располагаться позади трансгена(трансгенов). В качестве альтернативы, несколько широко используемых векторов экспрессии доступны в данной области и их получают из коммерческих источников, например, серии векторов pсDNA и pEF Invitrogen, pMSCV и pTK-Hyg от BD Sciences, pCMV-Script от Stratagene и т.д., которые можно использовать для рекомбинантной экспрессии белка, представляющего интерес, или для получения подходящих промоторов и/или последовательностей терминаторов транскрипции, последовательностей polyA и т.п.

Культура клеток может представлять собой любой тип культуры клеток, в том числе адгезивную культуру клеток, например, клетки, прикрепленные к поверхности культурального флакона или к микроносителям, а также суспензионную культуру. Манипуляции с суспензионными культурами наиболее крупного масштаба проводят в периодическом процессе или процессе с подпиткой, поскольку они являются наиболее простыми для управления и увеличения масштаба. В настоящее время непрерывные процессы на основе принципов

перфузии становятся более распространенными и они также являются подходящими. Подходящие питательные среды хорошо известны специалисту в данной области и могут, как правило, быть получены из коммерческих источников в больших количествах или произведены по заказу согласно стандартным протоколам. Культивирование можно проводить, например, в чашках, роллер-флаконах или в биореакторах, используя периодические, подпитываемые, непрерывные системы и т. п. Известны подходящие условия для культивирования клеток (смотри, например, Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973), и R.I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, fourth edition (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9)).

Настоящее изобретение также представляет композиции, содержащие F-полипептиды RSV до слияния и/или молекулу нуклеиновой кислоты, и/или вектор, как описано выше. Настоящее изобретение также представляет композиции, содержащие F-полипептид RSV до слияния, который демонстрирует эпитоп, присутствующий в конформации F-белка RSV до слияния, но отсутствует в конформации после слияния. Настоящее изобретение также представляет композиции, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор, кодирующие такой F-полипептид RSV до слияния. Настоящее изобретение также представляет иммуногенные композиции, содержащие F-полипептиды RSV до слияния, и/или молекулу нуклеиновой кислоты, и/или вектор, как описано выше. Настоящее изобретение также представляет применение стабилизированного F-полипептида RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектор в соответствии с настоящим изобретением для индуцирования у субъекта иммунного ответа к F-белку RSV. Дополнительно представлены способы индуцирования у субъекта иммунного ответа на F-белок RSV, предусматривающие введение субъекту F-полипептида RSV до слияния, и/или молекулы нуклеиновой кислоты, и/или вектора в соответствии с настоящим изобретением. Также представлены F-полипептиды RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты, и/или векторы в соответствии с настоящим изобретением для индуцирования иммунного ответа у субъекта к F-белку RSV. Также представлено применение F-

полипептидов RSV до слияния, и/или молекул нуклеиновой кислоты, и/или векторов в соответствии с настоящим изобретением для получения лекарственного средства для применения в индуцировании у субъекта иммунного ответа к F-белку RSV.

F-полипептиды RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты или векторы по настоящему изобретению можно использовать для предупреждения (профилактики) и/или для лечения инфекций RSV. В определенных вариантах осуществления предупреждение и/или лечение может быть направлено на группы пациентов, которые восприимчивы к инфекции RSV. Такие группы пациентов включают, без ограничений, например, пожилых (например, в возрасте ≥ 50 лет, в возрасте ≥ 60 лет и предпочтительно в возрасте ≥ 65 лет), молодых (например, в возрасте ≤ 5 лет, в возрасте ≤ 1 года), госпитализированных пациентов и пациентов, которые получали лечение противовирусным соединением, но продемонстрировали неудовлетворительный противовирусный ответ.

F-полипептиды RSV до слияния, молекулы нуклеиновых кислот и/или векторы в соответствии с настоящим изобретением можно использовать, например, в самостоятельном лечении и/или профилактике заболевания или состояния, вызванного RSV, или в комбинации с другими профилактическими и/или терапевтическими средствами лечения, такими как (существующими или будущими) вакцины, противовирусные средства и/или моноклональные антитела.

Настоящее изобретение дополнительно представляет способы предупреждения и/или лечения у субъекта инфекции RSV с использованием F-полипептидов RSV до слияния, молекул нуклеиновых кислот и/или векторов в соответствии с настоящим изобретением. В конкретном варианте осуществления способ предупреждения и/или лечения у субъекта инфекции RSV предусматривает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества F-полипептида RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектора, описанных выше. Терапевтически эффективное количество относится к количеству полипептида, молекулы нуклеиновой кислоты или вектора, которое является эффективным для предупреждения, уменьшение

интенсивности и/или лечения заболевания или состояния, возникшего в результате инфекции, вызванной RSV. Предупреждение охватывает подавление или уменьшение распространения RSV, или подавление или уменьшение проявления, развития или прогрессирования одного или нескольких симптомов, связанных с инфекцией, вызванной RSV. Уменьшение интенсивности, как используется в данном документе, может относиться к уменьшению видимых или ощутимых симптомов заболевания, виремии или других поддающихся измерению проявлений инфекции гриппа.

Для введения субъектам, таким как люди, в настоящем изобретении могут использоваться фармацевтические композиции, содержащие F-полипептид RSV до слияния, молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В настоящем контексте выражение "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель или наполнитель в используемых дозировках и концентрациях не вызовет каких-либо нежелательных или вредных эффектов у субъектов, которым их вводят. Такие фармацевтически приемлемые носители и наполнители хорошо известны из уровня техники (см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Novgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). F-полипептиды RSV или молекулы нуклеиновой кислоты предпочтительно составляют и вводят в виде стерильного раствора, хотя также возможно использование лиофилизированных препаратов. Стерильные растворы получают при помощи стерилизующей фильтрации или с помощью других способов, известных *per se* в уровне техники. Затем растворы лиофилизируют или расфасовывают в контейнеры, предназначенные для лекарственных форм. pH раствора обычно находится в диапазоне pH от 3,0 до 9,5, например, pH от 5,0 до 7,5. F-полипептиды RSV обычно находятся в растворе, имеющем подходящий фармацевтически приемлемый буфер, и композиция может также содержать соль. Необязательно может присутствовать стабилизирующее средство,

такое как альбумин. В определенных вариантах осуществления добавляют детергент. В определенных вариантах осуществления F-полипептиды RSV можно составлять в виде инъекционного препарата.

В некоторых вариантах осуществления композиция в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержит один или несколько адъювантов. Адъюванты, как известно в уровне техники, дополнительно повышают иммунный ответ в отношении применяемой антигенной детерминанты. Выражения "адъювант" и "иммуностимулятор" используют в данном документе взаимозаменяемо, и их определяют как одно или несколько веществ, вызывающих стимуляцию иммунной системы. В данном контексте адъювант используют для усиления иммунного ответа к F-полипептидам RSV по настоящему изобретению. Примеры подходящих адъювантов включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия; композиции на основе масляных эмульсий (или композиции типа масло в воде), в том числе сквален-водных эмульсий, таких как MF59 (смотри, например, WO 90/14837); составы с сапонами, такие как, например, QS21 и иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS) (смотри, например, US 5057540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); производные бактерий или микроорганизмов, примерами которых являются монофосфорил липид А (MPL), 3-О-деацелированный MPL (3dMPL), олигонуклеотиды, содержащие мотив CpG, ADP-рибозилирующие токсины бактерий или их мутантные формы, такие как термолабильный энтеротоксин LT из *E. coli*, холерный токсин СТ и т. п.; белки эукариотов (например, антитела или их фрагменты (например, направленные против самого антигена или CD1a, CD3, CD7, CD80) и лиганды к рецепторам (например, CD40L, GMCSF, GCSF и др.), которые стимулируют иммунный ответ при взаимодействии с клетками реципиентов. В определенных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат в качестве адъюванта алюминий, например, в форме гидроксида алюминия, фосфата алюминия, фосфата алюминия-калия или их комбинации в концентрациях 0,05–5 мг, например, 0,075–1,0 мг алюминия на дозу.

F-полипептиды RSV до слияния можно также вводить в

комбинации с наночастицами или конъюгированными с наночастицами, такими как, например, полимерами, липосомами, вирусосомами, вирус-подобными частицами. F-полипептиды до слияния можно комбинировать с наночастицами, инкапсулировать в наночастицах или конъюгировать с наночастицами с адъювантом или без него. Инкапсулирование в липосомы описано, например, в документе US 4235877. Конъюгирование с макромолекулами раскрыто, например, в документах US 4372945 или US 4474757.

В других вариантах осуществления композиции не содержат адъюванты.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение представляет способы получения вакцины против респираторного синцитиального вируса (RSV), включающие обеспечение композиции в соответствии с настоящим изобретением и помещение ее в фармацевтически приемлемую композицию. Выражение "вакцина" относится к средству или композиции, содержащим активный компонент, который является эффективным для индуцирования у субъекта определенной степени иммунитета к определенному патогенному микроорганизму или заболеванию, которые приведут по меньшей мере к снижению (до полного отсутствия включительно) тяжести, продолжительности или другого проявления симптомов, связанных с инфекцией патогенным микроорганизмом или заболеванием. В настоящем изобретении вакцина содержит эффективное количество F-полипептида RSV до слияния и/или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей F-полипептид RSV до слияния, и/или вектор, содержащий указанную молекулу нуклеиновой кислоты, который приводит к образованию иммунного ответа к F-белку RSV. Это обеспечивает способ предупреждения тяжелого заболевания нижних дыхательных путей, приводящего к госпитализации, и снижает частоту осложнений, таких как пневмония и бронхиолит у субъекта вследствие инфекции и репликации RSV. Выражение "вакцина" согласно настоящему изобретению подразумевает, что она представляет собой фармацевтическую композицию, и, таким образом, как правило, включает фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или наполнитель. Она может содержать или не содержать дополнительные

активные ингредиенты. В определенных вариантах осуществления она может представлять собой комбинированную вакцину, которая дополнительно содержит другие компоненты, которые индуцируют иммунный ответ, например, против других белков RSV и/или против других возбудителей инфекции. Введение дополнительных активных компонентов можно, например, осуществлять путем отдельного введения или путем введения комбинации продуктов из вакцин по настоящему изобретению и дополнительных активных компонентов.

Композиции можно вводить субъекту, например, субъекту-человеку. Суммарная доза F-полипептидов RSV в композиции для однократного введения может, например, составлять от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 10 мг, например, 1 мкг - 1 мг, например, 10 мкг - 100 мкг. Определение рекомендуемой дозы будет осуществляться в процессе эксперимента и является стандартным для специалистов в данной области.

Введение композиций в соответствии с настоящим изобретением можно осуществлять с использованием стандартных путей введения. Неограничивающие варианты осуществления включают парентеральное введение, такое как внутрикожное, внутримышечное, подкожное, чрескожное введение или введение через слизистые, например, интраназальное, пероральное и т. п. В одном варианте осуществления композицию вводят путем внутримышечной инъекции. Специалисту известны различные возможности введения композиции, например вакцины, для индуцирования иммунного ответа к антигену (антигенам), присутствующему в вакцине.

Субъект, как используется в данном документе, предпочтительно представляет собой млекопитающее, например, грызуна, например, мышь, хлопкового хомяка или примата, кроме человека, или человека. Субъект, предпочтительно, является субъектом-человеком.

Полипептиды, молекулы нуклеиновых кислот, векторы и/или комбинации можно также вводить в виде прайма или в виде буста в гомологичном или гетерологичном режиме прайм-буст. При проведении бустерной вакцинации обычно такую бустерную вакцину будут вводить одному и тому же субъекту с промежутком от одной недели до одного года, предпочтительно от двух недель до четырех

месяцев после введения композиции субъекту в первый раз (которое в данном случае называется "первичной вакцинацией"). В некоторых вариантах осуществления введение включает прайм и по меньшей мере одно бустерное введение.

В дополнение, полипептиды по настоящему изобретению можно применять в качестве диагностического средства, например, для тестирования иммунного статуса индивидуума путем установления способности антител в сыворотке крови такого индивидуума к связыванию с полипептидом по настоящему изобретению. Настоящее изобретение также относится к *in vitro* диагностическому способу для выявления у пациента присутствия инфекции RSV, при этом указанный способ включает стадии а) приведения в контакт биологического образца, полученного от указанного пациента, с полипептидом в соответствии с настоящим изобретением; и б) выявления присутствия комплексов антитело-полипептид.

Дополнительно настоящее изобретение предусматривает способ стабилизации конформации до слияния F-полипептида RSV, предусматривающий введение по меньшей мере одной мутации в домен F1 и/или F2 RSV по сравнению с доменом F1 и/или F2 RSV дикого типа, где по меньшей мере одна мутация блокирует альфа-спираль 4 от поворота или перемещения при помощи мутации в тройной спирали в вершине RSV (альфа-спирали 1, 4 и 5). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация в альфа 4 представляет собой мутацию аминокислотного остатка Leu в Ile в положении 203.

Стабилизированные F-полипептиды RSV до слияния, получаемые и/или полученные таким способом, тоже образуют часть настоящего изобретения, а также варианты их применения, как описано выше.

Примеры

ПРИМЕР 1

Для стабилизации подвижной вершины в конформации до слияния F-белка RSV вводили замену Leu203Ile в альфа4 в метастабильном варианте F-белка RSV со стабилизирующей мутацией S215P и C-концевым фибритиновым мотивом.

Экспрессия и очистка F-белка RSV.

Рекомбинантные белки экспрессировали в клетках FreeStyle

293 (Life Technologies). Клетки временно трансфицировали с помощью 293Fectin (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя и культивировали во встряхивателе-инкубаторе при 37°C и 10% CO₂. Супернатанты культур, содержащие F-белок, собирали на 5-й день после трансфекции. Простерилизованные фильтрацией супернатанты хранили при 4°C до использования. Рекомбинантные полипептиды очищали согласно 2-этапному протоколу с применением катионообменной хроматографии с последующей эксклюзионной хроматографией (фигура 1). На ионообменном этапе супернатант культуры разводили 2 объемами 50 mM NaOAc, pH 5,0, и пропускали через 5 мл колонку HiTrap Capto S (GE Healthcare) при скорости 5 мл в минуту. Затем колонки промывали 10 объемами, соответствующими объему колонки (CV), 20 mM NaOAc, 50 mM NaCl, 0,01% (об./об.) tween20, pH 5, и элюировали на 15% этапа элюированием посредством 50 mM NaOAc, 1 M NaCl, 0,01% (об./об.) tween20, pH 5. Элюат концентрировали, а затем белок очищали на колонке Superdex200 (GE Healthcare) с использованием 40 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,01% (об./об.) tween20 и pH 7,4 в качестве подвижного буфера. Очищенный белок анализировали на SDS-PAGE и нативном PAGE (фигура 2). Белки визуализировали на геле после окрашивания кумасси бриллиантовым голубым. Основные бэнды на SDS-PAGE соответствовали доменам F1 и F2 F-белка RSV в образцах в восстанавливающих условиях; в образцах в невосстанавливающих условиях основной бэнд соответствовал размеру доменов F1+F2, связанных вместе дисульфидными связями. На нативном PAGE электрофоретическая подвижность белка соответствовала одному из F-тримеров RSV. Конформацию до слияния очищенного белка подтверждали связыванием с антителом CR9501 (данные не показаны). Очищенный тримерный F-белок RSV до слияния хранили при 4°C до дальнейшего анализа.

Исследования стабильности.

Способность белка до слияния спонтанно превращаться в конформацию после слияния оценивали в анализе стабильности при хранении. Неочищенные образцы супернатантов клеточной культуры хранили при 4°C, а концентрацию F-белка в образцах измеряли на

приборе Octet путем количественного анализа, который описан выше. Измерения проводили в день сбора супернатанта (1-й день) и после хранения супернатанта в течение указанного периода времени. CR9501 представляет собой моноклональное антитело, которое распознает только конформацию F-белка до слияния (WO2012/006596), и его применяли для измерения концентрации F-белка RSV до слияния.

Температурную стабильность очищенных белков определяли с помощью дифференциальной сканирующей флуорометрии (DSF). Очищенный F-белок до слияния смешивали с оранжевым флуоресцентным красителем SYPRO (Life Technologies S6650) в 96-луночной планшете для оптической qPCR. Оптимальную концентрацию красителя и белка определяли экспериментально (данные не показаны). Все разведения белка производили в PBS, а в качестве вычитаемого эталонного значения использовали значения отрицательного контрольного образца, содержащего только краситель. Измерение проводили в приборе для проведения qPCR (Applied Biosystems ViiA 7) с использованием следующих параметров: температурный диапазон 25-95°C со скоростью 0,015°C в секунду. Данные собирали непрерывно. 1-ю производную кривых плавления строили с использованием программного обеспечения GraphPad PRISM (версии 5.04). Температуры плавления рассчитывались в точке минимума производной кривой.

Как показано на фигуре 3, метастабильный вариант F-белка, который был стабилизирован с помощью только замены S215P, практически полностью утрачивал связывание с Mab CR9501, которое специфично к конфигурации до слияния, после хранения в течение 5 дней при 4°C. В отличие от этого, дополнительная замена L203I значительно увеличила стабильность этого метастабильного варианта F-белка RSV. Общее связывание при исследовании связывания CR9501 в день сбора было выше, и лишь незначительное падение связывания CR9501 наблюдали после хранения в течение 15 дней при 4°C. Дополнительная замена Leu 203 на Ile повышала стабильность при хранении в исследовании F-белка до слияния по сравнению с метастабильным F-белком до слияния, который содержал

лишь одну замену S215P. Дополнительная замена L203I также увеличивала термостабильность (59,5°C) по сравнению с вариантом, который содержал замену N67I и S215P (57,0°C) в соответствии с результатами DSF-экспериментов (фигура 4).

Конструкции тестировали в отношении уровней экспрессии, стабильности при хранении и связывания с антителом CR9501, специфичным к конформации до слияния у F-белка RSV. Ниже приведены аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей и CDR тяжелых и легких цепей у данного антитела. CR9501 содержит связывающие участки антител, обозначенных как 58C5 в WO2012/006596.

ПРИМЕР 2

В соответствии с настоящим изобретением было показано, что комбинация замены Leu203Ile с другими стабилизирующими мутациями давала в результате очень стабильный белок RSV F.

Экспрессия, очистка и характеристика F-белка RSV.

Рекомбинантные белки экспрессировали и очищали, как описано выше. Очищенный белок анализировали на SDS-PAGE (фигура 5). Белки были чистыми с единственными наблюдаемыми на гелях бэндами, которые соответствовали доменам F1 и F2 F-белка RSV в образцах в восстанавливающих условиях и доменам F1+F2, соединенным вместе, в образцах в невосстанавливающих условиях. SEC-MALS-анализ очищенных образцов (фигура 6) показывал, что единственный вид белка, присутствовавший в образце, имел молекулярную массу ~170 кДа, что соответствовало ожидаемой молекулярной массе гликозилированного F-тримера RSV. SEC-MALS проводили на системе для HPLC Agilent с использованием колонки TSK G3000SWXL (Tosoh Bioscience). Измерения MALS проводили с использованием встроенного детектора MiniDAWN Treos (Wyatt Technology). Концентрацию белка отслеживали с помощью УФ-монитора на 280 нм и рефрактометрического детектора на 660 нм (Optilab TrEX, Wyatt Technology). Детекторы подключали в следующем порядке: UV, MALS, RI. В SEC-MALS-экспериментах использовали MALS-буфер (17,3 г Na₂HPO₄ * 2 H₂O/л, 7,3 г NaH₂PO₄ * H₂O/л, 2,9 г NaCl/л, pH 7) и скорость потока 1 мл/мин. Данные

анализировали с использованием программного обеспечения Astra 6.1 (Wyatt Technology) с применением рефрактометрического детектора и значением инкремента показателя преломления (dn/dc), равным 0,141 мл/г. Молекулярную массу определяли с помощью максимума пика результатов показателя преломления, общую площадь пика определяли с помощью % общей площади пика УФ-сигнала, скорректированной на коэффициент угасания.

Исследования стабильности.

Температурную стабильность очищенных белков определяли с помощью дифференциальной сканирующей флуорометрии (DSF), как описано в примере 1. Как показано на фигуре 4, при объединении замены L203I с S215P, D486N с или без N67I термостабильность белков увеличивалась до соответственно ~67 и ~70°C.

Таблица 1. Стандартные аминокислоты, аббревиатуры и свойства

Амино-кислота	3-буквенная	1-буквенная	Полярность боковой цепи	Заряд боковой цепи (pH 7,4)
аланин	Ala	A	неполярная	Нейтральный
аргинин	Arg	R	полярная	Положительный
аспарагин	Asn	N	полярная	Нейтральный
аспарагиновая кислота	Asp	D	полярная	Отрицательный
цистеин	Cys	C	неполярная	Нейтральный
глутаминовая кислота	Glu	E	полярная	Отрицательный
глутамин	Gln	Q	полярная	Нейтральный
глицин	Gly	G	неполярная	Нейтральный
гистидин	His	H	полярная	Положительный (10%); нейтральный (90%)
изолейцин	Ile	I	неполярная	Нейтральный
лейцин	Leu	L	неполярная	Нейтральный
лизин	Lys	K	полярная	Положительный
метионин	Met	M	неполярная	Нейтральный
фенилаланин	Phe	F	неполярная	Нейтральный
пролин	Pro	P	неполярная	Нейтральный

серин	Ser	S	полярная	Нейтральный
треонин	Thr	T	полярная	Нейтральный
триптофан	Trp	W	неполярная	Нейтральный
тирозин	Tyr	Y	полярная	Нейтральный
валин	Val	V	неполярная	Нейтральный

Таблица 2. Аминокислотные последовательности антител CR9501 и CR9502

Антитело	Домен VH	CDR1 VH	CDR2 VH	CDR3 VH
CR9501	Аминокислоты 1-125 с SEQ ID NO: 16	GASINSDNYWT (SEQ ID NO:1)	HISYTGNTYYTPSLKS (SEQ ID NO:2)	CGAYVLISNCGWFDS (SEQ ID NO:3)
CR9502	Аминокислоты 1-121 с SEQ ID NO: 18	GFTFSGHITIA (SEQ ID NO:7)	WVSTNNGNTEYAQKIQG (SEQ ID NO:8)	EWLVMGGFAFDH (SEQ ID NO:9)
Антитело	Домен VL	CDR1 VL	CDR2 VL	CDR3 VL
CR9501	Аминокислоты 1-107 с SEQ ID NO: 17	QASQDISTYLN (SEQ ID NO: 4)	GASNLET (SEQ ID NO:5)	QQYQYLPYT (SEQ ID NO:6)
CR9502	Аминокислоты 1-110 с SEQ ID NO: 19	GANNIGSQNVH (SEQ ID NO:10)	DDRDRPS (SEQ ID NO:11)	QVWDSSRDQAVI (SEQ ID NO:12)

Аминокислотная последовательность нескольких конструкций F RSV до слияния приведена ниже. Следует отметить, что нумерация аминокислот в различных конструкциях, описанных в данном документе, основана на последовательности дикого типа (SEQ ID NO: 13 с двумя модификациями (K66E и I76V)).

Последовательности

Полноразмерная последовательность F-белка RSV A2 (SEQ ID NO: 13)

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKENKCNNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
 KTNVTLSSKKRKRFLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSV
 LTSKVLDLKNYIDKQLLPIVVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTTPVSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIR
 KSDELLHNVNAVKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIA
 FSN

Полноразмерная последовательность F-белка RSV B1 (SEQ ID NO: 15)

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKETKCNNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARREAPQYMNYTINTTK
 NLNVSISKRRKRFLGFLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLNNGVSV
 LTSKVLDLKNYINNQLLPIVVKQSCRISNIETVIEFQQKNSRLEINREFSVNAGVTTPLSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
 SLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVVKLEGKNLYVKGEPI INYYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIR
 RSDELLHNVNTGKSTTNIMITTIIIVIIIVVLLSLIAIGLLLYCKAKNTPVTLSKDQLSGINNIA
 FSK

SEQ ID NO: 14 (фибритин)

GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

FA2, K66E, I76V, S215P (SEQ ID NO: 20)

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKENKCNNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
 KTNVTLSSKKRKRFLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSV
 LTSKVLDLKNYIDKQLLPIVVKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTTPVSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIR

KSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

FA2, K66E, I76V, L203I, S215P (SEQ ID NO: 21)

MELLILKANAIITTLTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
 KTNVTLSKRRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSV
 LTSKVLDLKNYIDKQILPIVKNQSCSIPNIETVIEFQOKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQOSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNNGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIR
 KSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

FA2, K66E, I76V, L203I, S215P, D486N (SEQ ID NO: 23)

MELLILKANAIITTLTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
 KTNVTLSKRRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSV
 LTSKVLDLKNYIDKQILPIVKNQSCSIPNIETVIEFQOKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQOSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNNGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIR
 KSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

FA2, K66E, N67I, I76V, L203I, S215P, D486N (SEQ ID NO: 24)

MELLILKANAIITTLTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKEIKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
 KTNVTLSKRRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSV
 LTSKVLDLKNYIDKQILPIVKNQSCSIPNIETVIEFQOKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQOSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNNGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIR
 KSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

**Полноразмерная последовательность белка F RSV CL57-v224
 (SEQ ID NO: 22)**

MELPILKTNAIITTLAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPAANNRARRELPRFMNYTLNNTK
 NNNVTLSKRRKRRFLGFLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSV

LTSKVLDLKNYIDKQLLPVIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTTPVSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
 NLCNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIR
 KSDELLHNVNVGKSTTNIMITTIIIVIIVILLLLIAVGLFLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIA
 FSN

CR9501, тяжелая цепь (SEQ ID NO: 16):

QVQLVQSGPGLVKPSQTLALTCNVSGASINSDNYWTWIRQRPGGGLEWIGHISYTGNT
 YYTPSLKSRLSMSLETSQSQFSLRLTSVTAADSAVYFCAACGAYVLI SNCGWFDSWGQGTQVTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YLSLVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

CR9501, легкая цепь (SEQ ID NO: 17):

EIVMTQSPSSLSASIGDRVTITCQASQDISTYLNWYQQKPGQAPRLLIYGASNLETGVP
 SRFTGSGYGTDFSVTISSSLQPEDIATYYCQQYQYLPYTFAPGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYE
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

CR9502, тяжелая цепь (SEQ ID NO: 18):

EVQLLQSGAELKKPGASVKISCKTSGFTFSGHTIAWVRQAPGQGLEWMGWVSTNNGNTE
 YAQKIQGRVMTMDTSTSTVYMELRSLTSDDTAVYFCAREWLVMGGFAPFDHWGQGTLLTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC

CR9502, легкая цепь (SEQ ID NO: 19):

QSVLTQASSVSVAPGQTARITCGANNIGSQNVHWYQQKPGQAPVLLVYDDRDRPSGIPD
 RFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRDQAVIFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP
 SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ
 WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTIAPTECS

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Jansen Vaccines and Prevention B.V.
<120> Стабилизированные растворимые F-полипептиды RSV до слияния
<130> 0259 WO 00 ORD
<160> 24
<170> PatentIn версия 3.5
<210> 1
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> CR9501 HCDR1
<400> 1
Gly Ala Ser Ile Asn Ser Asp Asn Tyr Tyr Trp Thr
1 5 10

<210> 2
<211> 16
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> CR9501 HCDR2
<400> 2
His Ile Ser Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Thr Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 3
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> CR9501 HCDR3
<400> 3
Cys Gly Ala Tyr Val Leu Ile Ser Asn Cys Gly Trp Phe Asp Ser
1 5 10 15

<210> 4
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> CR9501 LCDR1
<400> 4

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CR9501 LCDR2

<400> 5

Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CR9501 LCDR3

<400> 6

Gln Gln Tyr Gln Tyr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 7
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CR9502 HCDR1

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Ser Gly His Thr Ile Ala
1 5 10

<210> 8
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CR9502 HCDR2

<400> 8

Trp Val Ser Thr Asn Asn Gly Asn Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Ile Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 9
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CR9502 HCDR3

<400> 9

Glu Trp Leu Val Met Gly Gly Phe Ala Phe Asp His
1 5 10

<210> 10
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CR9502 LCDR1

<400> 10

Gly Ala Asn Asn Ile Gly Ser Gln Asn Val His
1 5 10

<210> 11
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CR9502 LCDR2

<400> 11

Asp Asp Arg Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 12
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CR9502 LCDR3

<400> 12

Gln Val Trp Asp Ser Ser Arg Asp Gln Ala Val Ile
1 5 10

<210> 13
<211> 574
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полноразмерная последовательность F-белка A2 RSV

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14
<211> 27
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ФИБРИТИН

<400> 14

Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys
1 5 10 15

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

<210> 15
<211> 574
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полноразмерная последовательность F-белка B1 RSV

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16
<211> 228

<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CR9501, тяжелая цепь

<400> 16

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ala Leu Thr Cys Asn Val Ser Gly Ala Ser Ile Asn Ser Asp
20 25 30

Asn Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Arg Pro Gly Gly Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly His Ile Ser Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Thr Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Ser Met Ser Leu Glu Thr Ser Gln Ser Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Arg Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Ser Ala Val Tyr Phe
85 90 95

Cys Ala Ala Cys Gly Ala Tyr Val Leu Ile Ser Asn Cys Gly Trp Phe
100 105 110

Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
130 135 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
210 215 220

Pro Lys Ser Cys
225

<210> 17

<211> 214

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CR9501, легкая цепь

<400> 17

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Ser Val Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gln Tyr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Ala Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 18

<211> 224

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CR9502, тяжелая цепь

<400> 18

Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly His
20 25 30

Thr Ile Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Val Ser Thr Asn Asn Gly Asn Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Ile
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Met Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Trp Leu Val Met Gly Gly Phe Ala Phe Asp His Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

<210> 19

<211> 215

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CR9502, легкая цепь

<400> 19

Gln Ser Val Leu Thr Gln Ala Ser Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45

Asp Asp Arg Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Arg Asp Gln
85 90 95

Ala Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
100 105 110

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
115 120 125

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
130 135 140

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
145 150 155 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
165 170 175

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
180 185 190

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
195 200 205

Ile Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 20

<211> 544

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FA2, K66E, I76V, S215P.

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Ala Ile Gly Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln
515 520 525

Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu
530 535 540

<210> 21
<211> 544
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FA2, K66E, I76V, L203I, S215P

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Ala Ile Gly Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln
515 520 525

Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu
530 535 540

<210> 22

<211> 574

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полноразмерная последовательность F-белка CL57-v224 RSV

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Leu Phe Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

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

<210> 23

<211> 544

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FA2, K66E, I76V, L203I, S215P, D486N;

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Ala Ile Gly Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln
515 520 525

Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu
530 535 540

<210> 24

<211> 544

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FA2, K66E, N67I, I76V, L203I, S215P, D486N

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Ala Ile Gly Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln
515 520 525

Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu
530 535 540

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный полипептид слияния (F) респираторно-синцитиального вируса (RSV) до слияния, где полипептид содержит по меньшей мере две стабилизирующие мутации в домене F1 и/или F2 по сравнению с доменом F1 и/или F2 RSV в F-белке RSV дикого типа, где по меньшей мере одна из стабилизирующих мутаций представляет собой мутацию аминокислотного остатка L в положении 203 в I.

2. F-полипептид RSV до слияния по п. 1, где полипептид дополнительно содержит мутацию аминокислотного остатка S в положении 215, предпочтительно мутацию аминокислотного остатка S в положении 215 в P.

3. F-полипептид RSV до слияния по п. 1 или п. 2, где полипептид содержит по меньшей мере один эпитоп, который является специфическим к конформации F-белка до слияния, где по меньшей мере один эпитоп распознается специфическим моноклональным антителом до слияния, содержащим CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 2, CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 3 и CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 4, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 5 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 6, и/или специфическим моноклональным антителом до слияния, содержащим CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 8, CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 9 и CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 10, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 67 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 11.

4. F-полипептид RSV до слияния по любому из пп. 1, 2 или п. 3, где полипептид является тримерным.

5. F-полипептид RSV до слияния по любому из пп. 1-4, содержащий усеченный домен F1, где полипептид содержит гетерологичный домен тримеризации, связанный с указанным усеченным доменом F1.

6. F-полипептид RSV до слияния по п. 5, где гетерологичный домен тримеризации содержит аминокислотную последовательность GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 14).

7. F-полипептид RSV до слияния по п. 5 или п. 6, где домен

тримеризации связан с аминокислотным остатком 513 F-белка RSV.

8. F-полипептид RSV до слияния по любому из пп. 1-7, где полипептид содержит по меньшей мере одну дополнительную мутацию, где указанная мутация выбрана из группы, состоящей из

- (a) мутации аминокислотного остатка в положении 46;
- (b) мутации аминокислотного остатка в положении 67;
- (c) мутации аминокислотного остатка в положении 83;
- (d) мутации аминокислотного остатка в положении 92;
- (e) мутации аминокислотного остатка в положении 184;
- (f) мутации аминокислотного остатка в положении 207;
- (g) мутации аминокислотного остатка в положении 486 и
- (h) мутации аминокислотного остатка в положении 487.

9. F-полипептид RSV до слияния по п. 8, где по меньшей мере одна дополнительная мутация выбрана из группы, состоящей из

- (a) мутации аминокислотного остатка S в положении 46 в G;
- (b) мутации аминокислотного остатка N/T в положении 67 в I;
- (c) мутации аминокислотного остатка L в положении 83 в M;
- (d) мутации аминокислотного остатка E в положении 92 в D;
- (e) мутации аминокислотного остатка G в положении 184 в N;
- (f) мутации аминокислотного остатка V в положении 207 в I;
- (g) мутации аминокислотного остатка D в положении 486 в N и
- (h) мутации аминокислотного остатка E в положении 487 в Q,

N или I.

10. F-полипептид RSV до слияния по любому из предыдущих пунктов, где домен F1 и/или домен F2 происходят из штамма A RSV.

11. F-полипептид RSV до слияния по любому из предыдущих пунктов, где домен F1 и/или домен F2 происходят из штамма B RSV.

12. F-полипептид RSV до слияния по любому из предыдущих пунктов, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24.

13. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая F-полипептид RSV до слияния по любому из предыдущих пунктов 1-12.

14. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 13, где молекула нуклеиновой кислоты была оптимизирована по кодонам для экспрессии в клетках млекопитающих.

15. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 13 или п. 14.

16. Композиция, содержащая F-полипептид RSV до слияния по любому из пп. 1-12, молекулу нуклеиновой кислоты по п. 13 или п. 14 и/или вектор по п. 15.

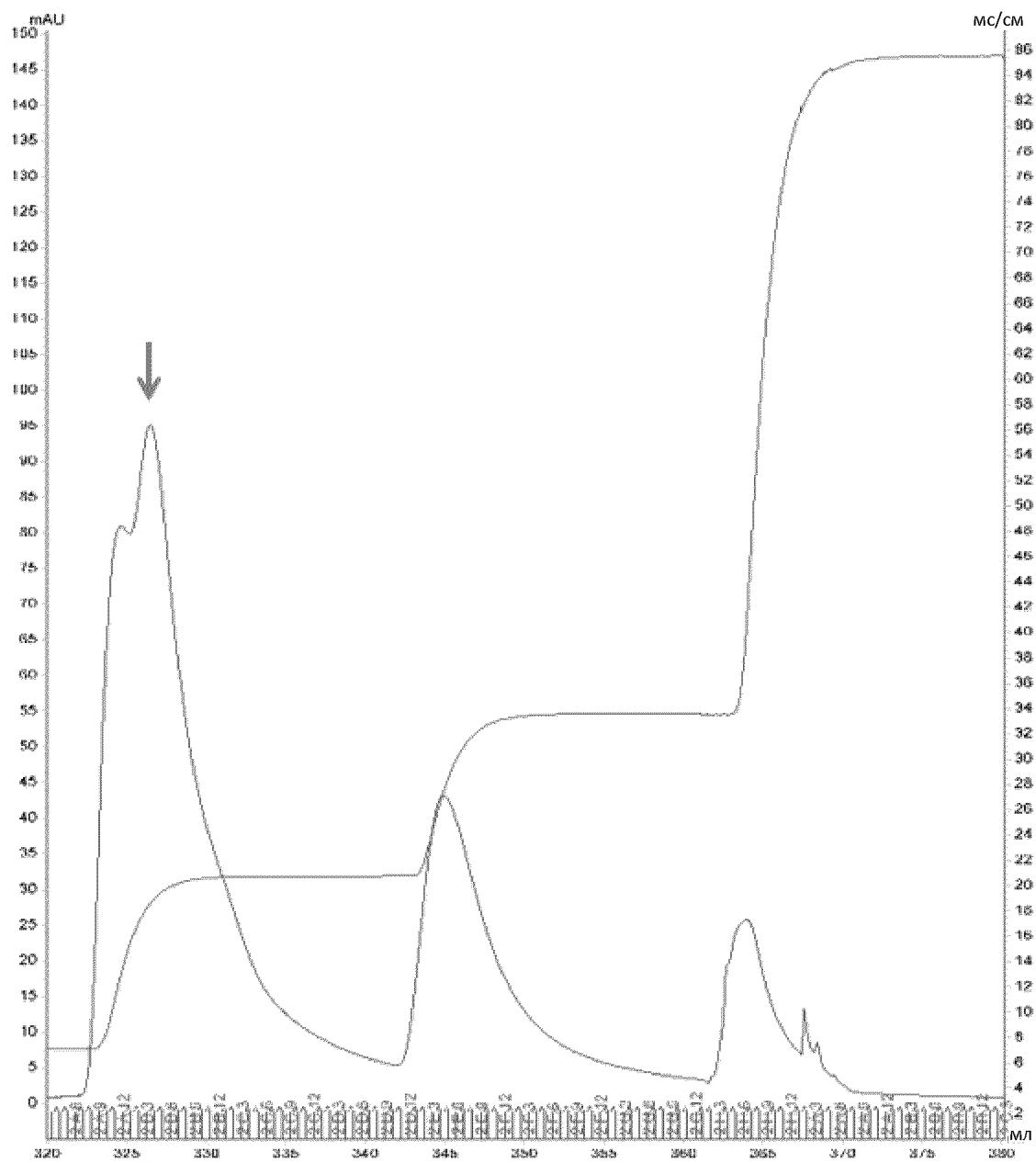
17. F-полипептид RSV до слияния по любому из пп. 1-12, молекула нуклеиновой кислоты по п. 13 или п. 14 и/или вектор по п. 15 для применения в индуцировании иммунного ответа к F-белку RSV.

18. F-полипептид RSV до слияния по любому из пп. 1-12, молекула нуклеиновой кислоты по п. 13 или п. 14 и/или вектор по п. 15 для применения в качестве вакцины.

19. F-полипептид RSV до слияния по любому из пп. 1-12, молекула нуклеиновой кислоты по п. 13 или п. 14 и/или вектор по п. 15 для применения в профилактике и/или лечении инфекции, вызванной RSV.

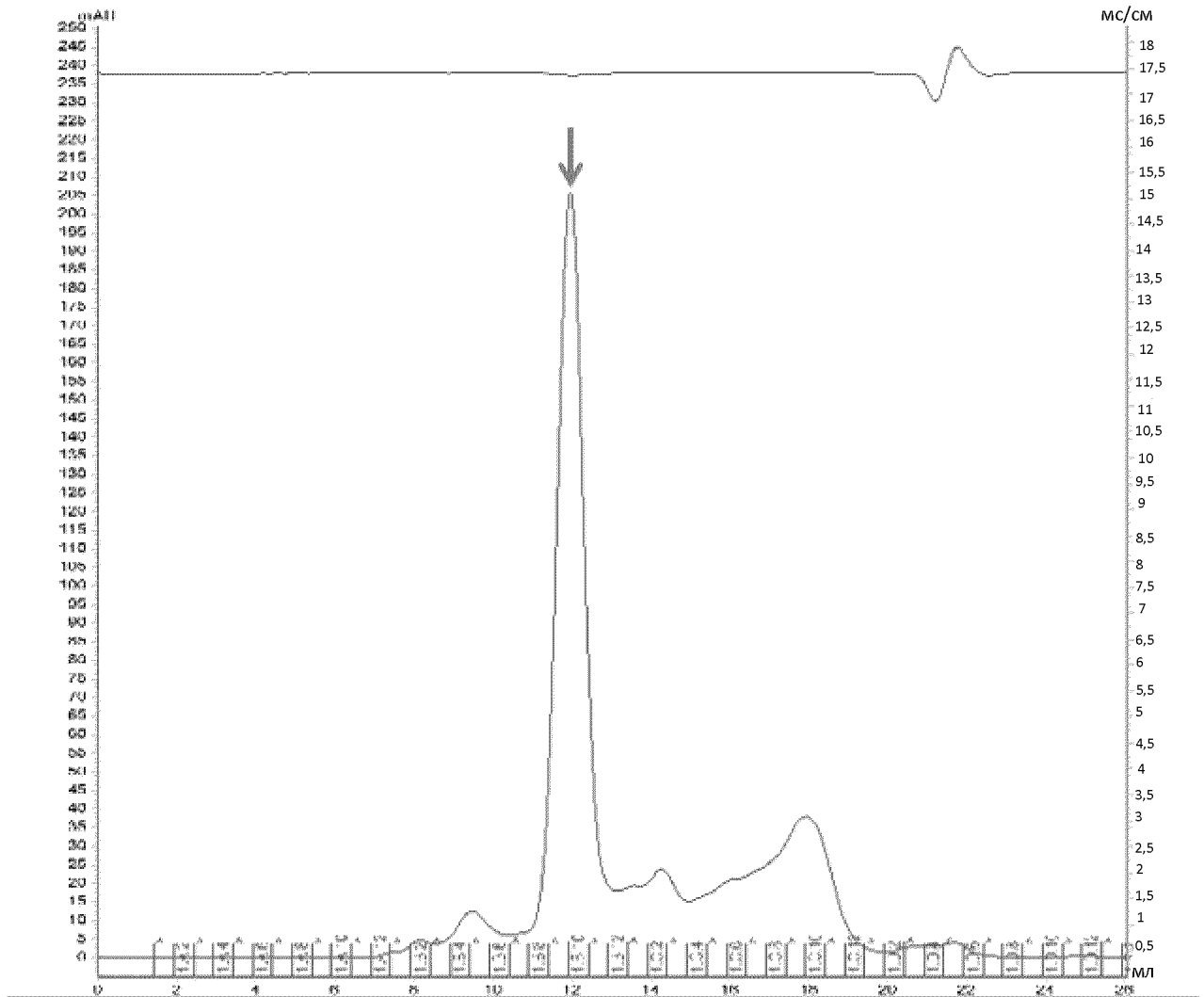
По доверенности

A



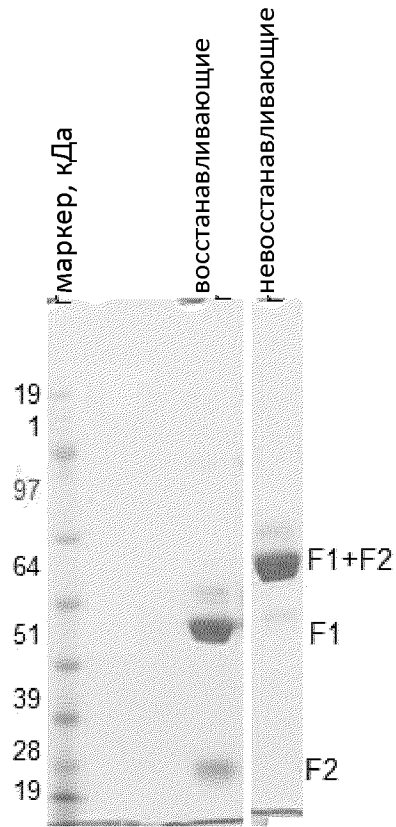
Фиг. 1

B

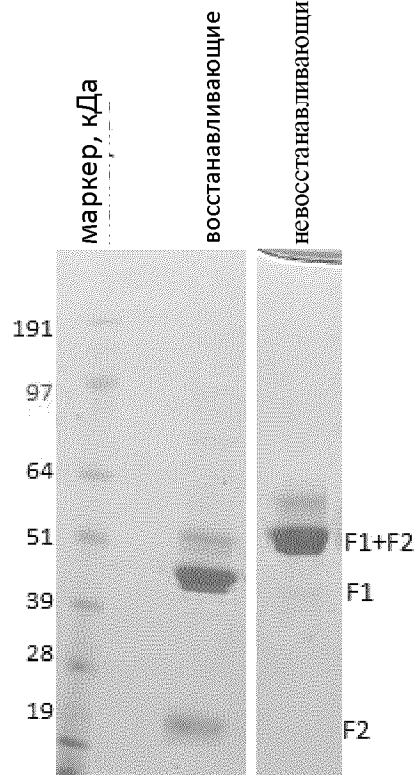


Фиг. 1 - продолжение

A

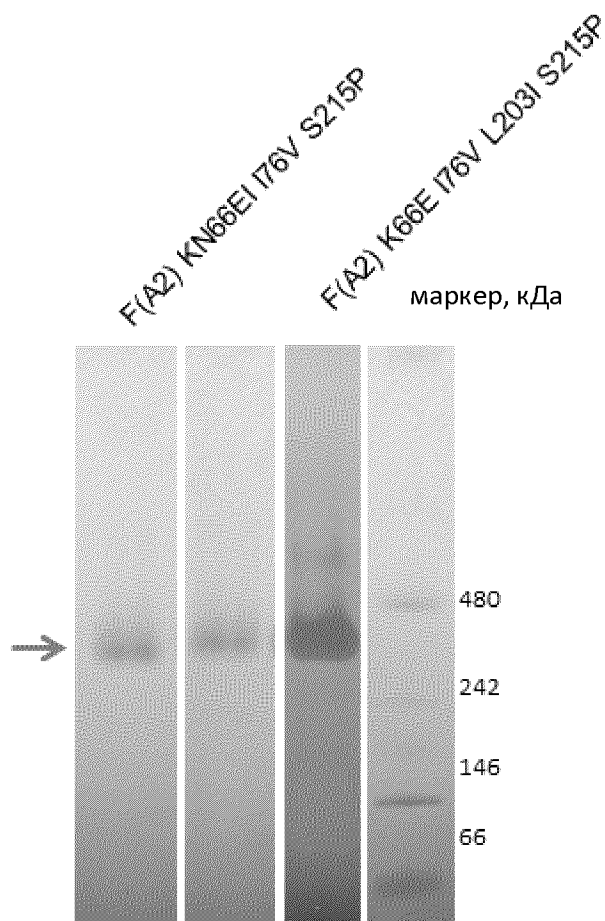


B

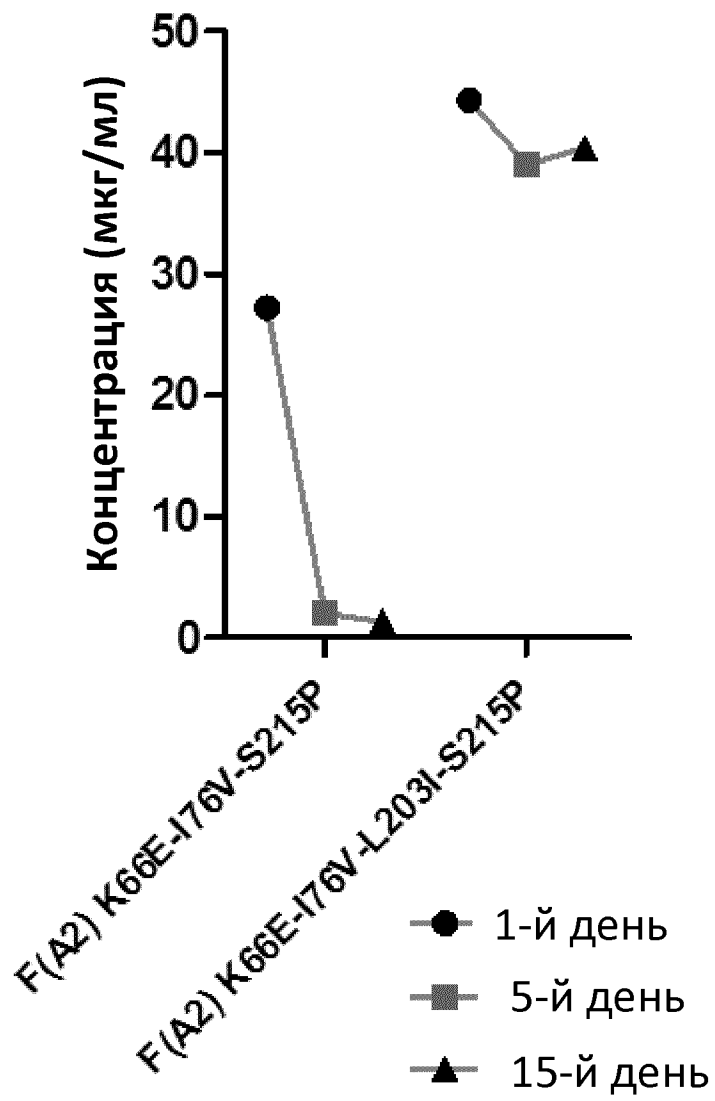


Фиг. 2

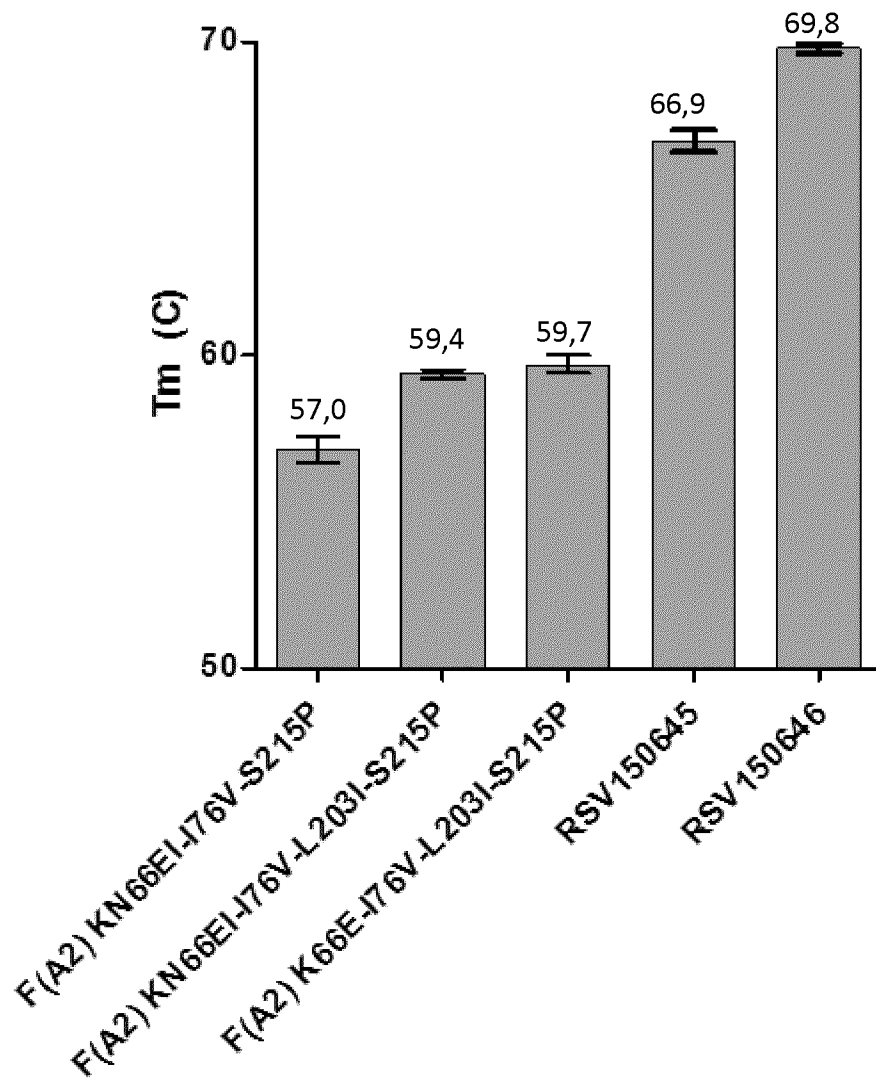
C



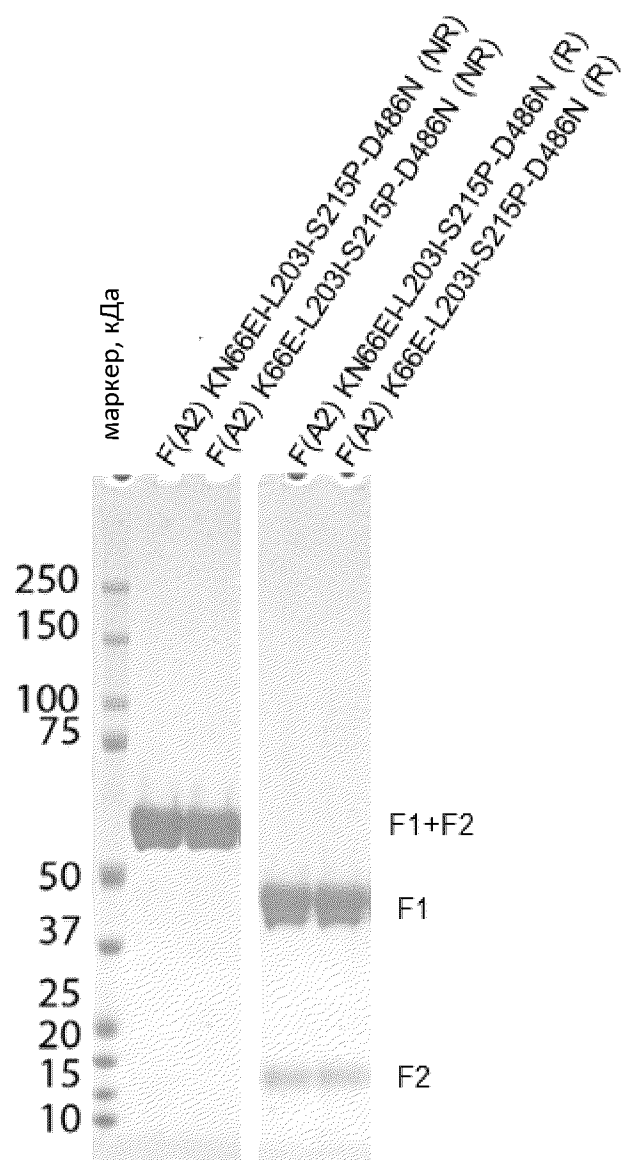
Фиг. 2 - продолжение



Фиг. 3

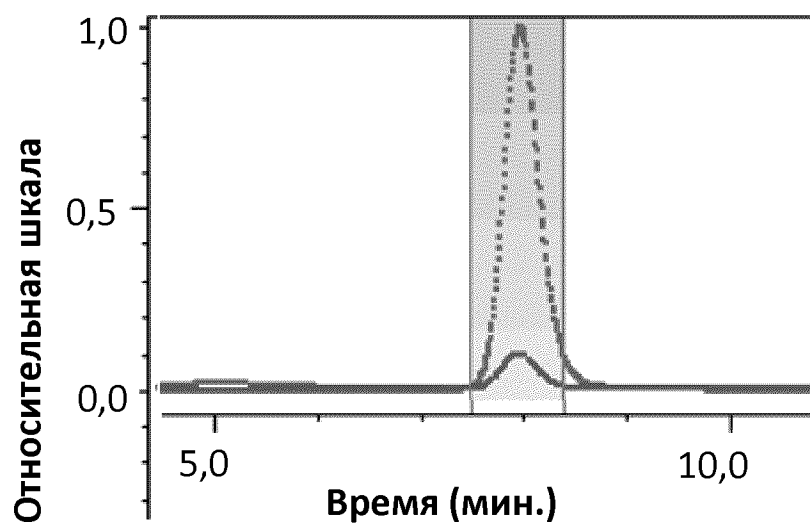


Фиг. 4

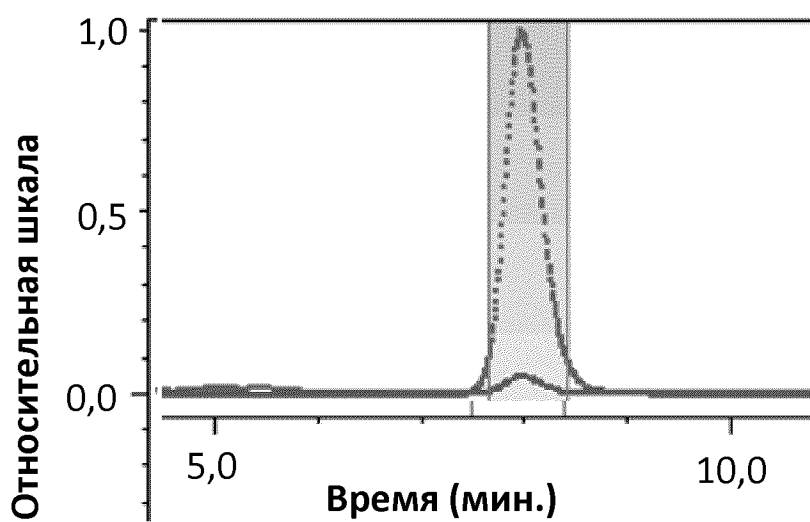


Фиг. 5

А



В



• LS • LV • cPI

Фиг. 6