

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034653**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.03

(51) Int. Cl. **C07K 14/135 (2006.01)**

(21) Номер заявки
201690031

(22) Дата подачи заявки
2014.06.17

(54) СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ РАСТВОРИМЫЕ F-ПОЛИПЕПТИДЫ RSV ПЕРЕД СЛИЯНИЕМ

(31) **13172256.3**

(32) **2013.06.17**

(33) **EP**

(43) **2016.07.29**

(86) **PCT/EP2014/062655**

(87) **WO 2014/202570 2014.12.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:
**Лангедейк Йоханнес Петрус Мария,
Краруп Андерс (NL)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) DATABASE EMBL [Online] 28 August 1995 (1995-08-28), "Human respiratory syncytial virus, strain RSB89-1734, fusion protein (F) mRNA, complete cds.", XP002729919, retrieved from EBI accession no. EM STD:U31560 Database accession no. U31560 the whole document

WO-A1-2012158613

J. S. MCLELLAN ET AL.: "Structure-Based Design of a Fusion Glycoprotein Vaccine for Respiratory Syncytial Virus", SCIENCE, vol. 342, no. 6158, 31 October 2013 (2013-10-31), pages 592-598, XP055132637, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1243283 page 592, column 1, paragraph 3 table 1

M. MAGRO ET AL.: "Neutralizing antibodies against the preactive form of respiratory syncytial virus fusion protein offer unique possibilities for clinical intervention", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 109, no. 8, 21 February 2012 (2012-02-21), pages 3089-3094, XP055067859, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1115941109 figure 4

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

B1

034653

034653

B1

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

Предпосылки изобретения

Респираторный синцитиальный вирус (RSV) представляет собой оболочечный вирус с несегментированной одноцепочечной РНК с негативной полярностью из семейства Paramyxoviridae, рода Pneumovirus. 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 младше 2 лет RSV является наиболее распространенным возбудителем заболеваний дыхательного тракта, который является причиной примерно 50% госпитализаций вследствие респираторных инфекций, с пиком госпитализации, наблюдающимся в 2-4-месячном возрасте. Сообщалось, что практически все дети к двухлетнему возрасту были инфицированы RSV. Повторные инфекции в течение жизни связаны с малоэффективным врожденным иммунитетом. У пожилых людей уровень тяжести заболевания, вызванного RSV, смертность и заболеваемость занимают второе место, уступая лишь инфекциям, вызванным непандемическим гриппом А.

Для инфицирования клетки-хозяина RSV, подобно другим оболочечным вирусам, таким как вирус гриппа и HIV, требуют слияния вирусной мембраны с мембраной клетки-хозяина. Что касается RSV, консервативный белок слияния (F-белок RSV) подвергает слиянию вирусные мембраны и клеточные мембраны клетки-хозяина. В современных моделях на основе исследований парамиксовирусов F-белок RSV исходно уложен в конформацию "перед слиянием". Метастабильная структура была выяснена лишь недавно, в комплексе со стабилизирующим Fab-фрагментом нейтрализующего антитела (McLellan et al., Science 340 (6136) :1113-7, 2013). Во

время входа в клетку, конформация перед слиянием претерпевает рефолдинг и конформационные изменения к ее конформации "после слияния" (McLellan, J. Virol 85(15):7788-96, 2010; Swanson, PNAS 108(23):9619-24, 2011). Таким образом, F-белок RSV представляет собой метастабильный белок, который управляет слиянием мембран путем сочетания необратимого рефолдинга белка с соединением мембран в метастабильную форму при помощи исходного фолдинга (конформация перед слиянием), которая в дальнейшем подвергается дискретным/стадийным конформационным изменениям до более низкоэнергетической конформации (конформации после слияния).

Эти наблюдения указывают на то, что F-белок RSV перед слиянием и после слияния отличается в антигенном отношении (Calder, L. J. et al. Virology 271, 122-131 (2000)).

Вакцина против инфекции RSV в настоящее время не доступна, хотя и очень желательна. Вакцины-кандидаты на основе F-белка RSV оказались неэффективными вследствие проблем, связанных, например, со стабильностью, чистотой, воспроизводимостью и эффективностью. Как указывалось выше, кристаллические структуры обнаружили значительное конформационное изменение между состояниями перед слиянием и после слияния. Величина перестройки предполагала, что только часть антител, направленных на конформацию RSV-F после слияния, будет способна к перекрестной реакции с нативной конформацией шиповидного отростка перед слиянием на поверхности вируса. Соответственно, усилия для получения вакцины против RSV сосредотачивались на разработке вакцин, которые содержат формы F-белка RSV перед слиянием (см., например, WO2010/1149745, WO2010/1149743, WO2009/1079796, WO2012/158613). Однако данные усилия не дали стабильных F-полипептидов RSV перед слиянием, которые можно было бы использовать в качестве кандидатов для испытания у людей.

Краткое описание настоящего изобретения

Настоящее изобретение представляет стабильные, рекомбинантные полипептиды слияния (F) респираторного синцитиального вируса (RSV) перед слиянием, т.е. F-полипептиды RSV, которые являются стабильными в конформации перед слиянием. F-полипептиды RSV по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один эпитоп, который является специфичным к конформации F-белка перед слиянием. В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV перед слиянием являются растворимыми. Настоящее изобретение также представляет молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие F-полипептиды RSV перед слиянием 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 против F-белка RSV, в частности, их применению в качестве вакцины. Настоящее изобретение относится также к способам индуцирования у субъекта иммунного ответа против респираторного синцитиального вируса (RSV), включающим введение субъекту эффективного количества F-полипептида RSV перед слиянием, 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 респираторно-

го синцитиального вируса (RSV), включающему введение субъекту эффективного количества иммуногенной композиции, содержащей F-полипептид RSV перед слиянием, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей упомянутый F-полипептид RSV и/или вектор, содержащий молекулу упомянутой нуклеиновой кислоты.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 - SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях с DM RSV перед слиянием, DM = двойной мутант (N67I+S215P = SEQ ID NO: 21) и DM+CC = двойной мутант + DE486CC = SEQ ID NO: 94).

Фиг. 2 - анализ супернатанта посредством NativePAGE из Линии 2: DM = двойной мутант (N67I + S215P = SEQ ID NO: 21) и Линия 1: DM+CC = двойной мутант + DE486CC = SEQ ID NO: 94).

Фиг. 3: А) Гельфильтрационная хроматограмма Superdex200 элюата Pref N67I E161P S215P, RSV A2, фибритин (SEQ ID NO: 91) из ионообменной колонки. В) анализ SDS-PAGE F-белка перед слиянием, содержащего пик от хроматограммы SEC в восстанавливающих условиях. С) Анализ очищенного F-белка RSV в фазе перед слиянием посредством NativePAGE (SEQ ID NO: 91, Линия 2), по сравнению с очищенным двойным мутантом F RSV в фазе перед слиянием (SEQ ID NO: 21, Линия 1).

Фиг. 4 - титры VNA у мышей на 6 неделе после прайм-буста на 0 и 4 неделе иммуногенами в дозах согласно табл. 14.

Фиг. 5 - титры VNA хлопковых крыс на 7 неделе после прайм-буста на 0 и 4 неделе иммуногенами и дозами согласно табл. 15.

Фиг. 6 - вирусная нагрузка в легких и носу на 5 день после i.n. контрольного заражения с использованием RSV.

Подробное описание изобретения

Белок слияния (F) респираторного синцитиального вируса (RSV) участвует в слиянии вирусной мембраны с мембраной клетки-хозяина, которое требуется для инфицирования. М-РНК белка F в 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: 1), которая удаляется сигнальной пептидазой в эндоплазматическом ретикулууме. F0 расщепляется на два сайта (между аминокислотными остатками 109/110 и 136/137) клеточной протеазой (в особенности, фурином или фуриноподобным), удаляющей короткую гликозилированную вставочную последовательность (также относящуюся к области р27, содержащей аминокислотные остатки 110-136, и образующей два домена или субъединицы, обозначенные F1 и F2). Домен F1 (аминокислотные остатки 137-574) содержит гидрофобный пептид слияния на своем N-конце, а C-конец содержит трансмембранный (ТМ) (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.

Вакцины против инфекции RSV в настоящее время не существует, хотя она и очень желательна. 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, подобной конформации F-белка RSV в состоянии перед слиянием, который стабилен в течение продолжительного периода и может быть получен в достаточных количествах. Кроме того, для вакцины на основе субъединицы необходимо осуществить усечение F-белка RSV путем делеции трансмембранного (ТМ) и цитоплазматического участка с получением растворимого секретрируемого F-белка (sF). Поскольку участок ТМ отвечает за прикрепление к мембране и тримеризацию, дрейфующий растворимый F-белок является гораздо более лабильным, чем первичный продукт трансляции, и будет с легкостью подвергаться рефолдингу в конечное состояние после слияния. Для получения растворимого F-белка в стабильной конформации перед слиянием, который демонстрирует высокие уровни экспрессии и высокую стабильность, необходимо, таким образом, стабилизировать конформацию перед слиянием.

Стабилизация F-белка другого парамиксовируса в конформации перед слиянием была успешно выполнена для вируса парагриппа типа 5 (PIV5). Yin et al. (Nature 439: 38-44 (2006)), таким образом, стабилизировали структуру перед слиянием F-белка PIV-5 с помощью мутации сайта расщепления фурином в F0, что блокировало процессинг в F1 и F2. Кроме того, трансмембранный (ТМ) и цитоплазматический домен были замещены широко известным спиральным доменом тримеризации: GCN4pII. Этот домен образует тримерную геликоидальную суперспиральную структуру и является модификацией встречающегося в природе димерного спирального суперспирального пептида GCN4 (O'Shea et al., Science 243: 538-542 (1989)). Пептид GCN4-pII, в котором аминокислотная последовательность лейциновой застежки GCN4 была замещена изолейциновыми остатками в каждом положении a и d гептада, как показано, образует трехцепочечную параллельную альфа-петлевую суперспираль (Harbury et al., Science 262: 1401-1407 (1993)).

Для стабилизации F RSV в конформации перед слиянием была опробована такая же стратегия, т.е. мутация сайта расщепления фурина и слияние эктодомена RSV-F с доменом тримеризации GCN4pII (как раскрыто, например, в WO2010/149743, WO2010/149745, WO2009/079796, WO2012/158613) или доменом тримеризации фибритина (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 природного домена тримеризации (Letarov et al., Biochemistry Moscow 64: 817-823 (1993); S-Guthe et al., J. Mol. Biol. 337: 905-915. (2004)). Однако, эти усилия не привели к получению стабильного белка RSV-F перед слиянием. Более того, эти усилия даже не привели к получению кандидатов, пригодных для испытания у людей.

Настоящее изобретение далее представляет стабильные рекомбинантные F-полипептиды RSV перед слиянием, т.е. F-полипептиды RSV, которые являются стабилизированными в конформации перед слиянием. В исследовании, которое привело к настоящему изобретению, были введены и/или объединены несколько стадий модификации для получения упомянутых стабильных растворимых F-полипептидов RSV перед слиянием. Стабильные F-полипептиды RSV перед слиянием по настоящему изобретению находятся в конформации перед слиянием, т.е. они содержат (демонстрируют) по меньшей мере один эпитоп, который является специфичным к конформации F-белка перед слиянием. Эпитоп, который является специфичным к конформации F-белка перед слиянием, представляет собой эпитоп, который не представлен в конформации после слияния. Не ограничиваясь конкретной теорией, полагают, что конформация F-белка RSV перед слиянием 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.

Полипептиды по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один эпитоп, который распознается специфическим моноклональным антителом перед слиянием, содержащим CDR1-участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 54, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 55, CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 56 и CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 62, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 63 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 64 (далее в этом документе упоминаемый как CR9501), и/или специфическим моноклональным антителом перед слиянием, содержащим CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 58, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 59, CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 60 и CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 66, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 67 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 68 (упоминаемый как CR9502). CR9501 и CR9502 содержат переменные участки тяжелой и легкой цепи и, таким образом, связывающие специфичности антител 58C5 и 30D8, соответственно, как было показано ранее, специфично связывающиеся с F-белком RSV в его конформации перед слиянием, но не в конформации после слияния (см. WO2012/006596).

В определенных вариантах осуществления рекомбинантные F-полипептиды RSV перед слиянием содержат по меньшей мере один эпитоп, который распознается по меньшей мере одним специфичным моноклональным антителом перед слиянием, как описано выше, и полипептиды являются примерными.

Стабильные F-полипептиды RSV перед слиянием по настоящему изобретению содержат домен F1 и домен F2, где полипептиды содержат по меньшей мере одну мутацию, по сравнению с доменами F1 и F2 дикого типа, выбранную из группы, состоящей из:

- (a) мутации аминокислотного остатка в положении 161;
- (b) мутации аминокислотного остатка в положении 182;
- (c) мутации аминокислотного остатка в положении 173 и
- (d) мутации аминокислотного остатка D в положении 486 в С (D486C), в комбинации с мутацией аминокислотного остатка D в положении 489 в С (D489C) или мутацией аминокислотного остатка E в положении 487 в С (E487C).

В некоторых вариантах осуществления стабильные F-полипептиды RSV перед слиянием содержат домен F1 и домен F2, где полипептиды содержат по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из:

- (a) мутации аминокислотного остатка в положении E 161 в P, Q или G (E161P, E161Q) или E161G);
- (b) мутации аминокислотного остатка S в положении 182 в P (S182P);
- (c) мутации аминокислотного остатка S, T или N в положении 173 в P (S173P) и
- (d) мутации аминокислотного остатка D в положении 486 в С (D486C), в комбинации с мутацией аминокислотного остатка D в положении 489 в С (D489C) или мутацией аминокислотного остатка E в положении 487 в С (E487C).

В определенных вариантах осуществления F-полипептиды RSV содержат мутацию аминокислотного остатка в положении 67 и/или мутацию аминокислотного остатка в положении 215.

В определенных вариантах осуществления стабильные F-полипептиды RSV перед слиянием, таким образом, содержат домен F1 и домен F2, где полипептиды содержат мутацию аминокислотного остатка в положении 67 и/или мутацию аминокислотного остатка в положении 215, а также по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из:

- (a) мутации аминокислотного остатка в положении 161;
- (b) мутации аминокислотного остатка в положении 182;
- (c) мутации аминокислотного остатка в положении 173 и
- (d) мутации аминокислотного остатка D в положении 486 в С (D486C), в комбинации с мутацией аминокислотного остатка D в положении 489 в С (D489C) или мутацией аминокислотного остатка E в положении 487 в С (E487C).

В некоторых вариантах осуществления стабильные F-полипептиды RSV перед слиянием содержат домен F1 и домен F2, где полипептиды содержат мутацию аминокислотного остатка N или T в положении 67 и/или мутацию аминокислотного остатка S в положении 215, и в которых полипептиды дополнительно содержат по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из:

- (a) мутации аминокислотного остатка в положении E 161 в P, Q или G (E161P, E161Q) или E161G);
- (b) мутации аминокислотного остатка S в положении 182 в P (S182P);
- (c) мутации аминокислотного остатка S, T или N в положении 173 в P (S173P) и
- (d) мутации аминокислотного остатка D в положении 486 в C (D486C), в комбинации с мутацией аминокислотного остатка D в положении 489 в C (D489C) или мутацией аминокислотного остатка E в положении 487 в C (E487C).

В некоторых вариантах осуществления стабильные F-полипептиды RSV перед слиянием содержат связывающую последовательность, содержащую от 1 до 10 аминокислот, связывающую домен F1 и домен F2.

В некоторых вариантах осуществления стабильные F-полипептиды RSV перед слиянием в соответствии с настоящим изобретением содержат, таким образом, домен F1 и домен F2, а также связывающую последовательность, содержащую от 1 до 10 аминокислотных остатков, связывающую упомянутый домен F1 и упомянутый домен F2, где полипептиды содержат по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из:

- (a) мутации аминокислотного остатка в положении E 161 в P, Q или G (E161P, E161Q) или E161G);
- (b) мутации аминокислотного остатка S в положении 182 в P (S182P);
- (c) мутации аминокислотного остатка S, T или N в положении 173 в P (S173P), а также
- (d) мутации аминокислотного остатка D в положении 486 в C (D486C), в сочетании с мутацией аминокислотного остатка D в положении 489 в C (D489C) или мутацией аминокислотного остатка E в положении 487 в C (E487C).

В некоторых вариантах осуществления стабильные F-полипептиды RSV перед слиянием дополнительно содержат мутацию аминокислотного остатка N или T в положении 67 и/или мутацию аминокислотного остатка S в положении 215. В некоторых вариантах осуществления стабильные F-полипептиды RSV перед слиянием дополнительно содержат мутацию аминокислотного остатка N или T в положении 67 (N/T67I) в I и/или мутацию аминокислотного остатка S в положении 215 в P (S215P).

В некоторых вариантах осуществления стабильные F-полипептиды RSV перед слиянием в соответствии с настоящим изобретением содержат укороченный домен F1.

В некоторых вариантах осуществления стабильные F-полипептиды RSV перед слиянием в соответствии с настоящим изобретением, таким образом, содержат укороченный домен F1 и домен F2, а также необязательную связывающую последовательность, содержащую от 1 до 10 аминокислотных остатков, связывающую упомянутый укороченный домен F1 с доменом F2, где полипептиды содержат по меньшей мере одну дополнительную мутацию, выбранную из группы, состоящей из:

- (a) мутации аминокислотного остатка в положении E 161 в P, Q или G (E161P, E161Q) или E161G);
- (b) мутации аминокислотного остатка S в положении 182 в P (S182P);
- (c) мутации аминокислотного остатка S, T или N в положении 173 в P (S173P) и
- (d) мутации аминокислотного остатка D в положении 486 в C (D486C), в сочетании с мутацией аминокислотного остатка D в положении 489 в C (D489C) или мутацией аминокислотного остатка E в положении 487 в C (E487C).

В некоторых вариантах осуществления полипептиды дополнительно содержат мутацию аминокислотного остатка N или T в положении 67 и/или мутацию аминокислотного остатка S в положении 215. В некоторых вариантах осуществления стабильные F-полипептиды RSV перед слиянием дополнительно содержат мутацию аминокислотного остатка N или T в положении 67 (N/T67I) в I и/или мутацию аминокислотного остатка S в положении 215 в P (S215P).

В соответствии с настоящим изобретением, полипептиды по данному изобретению, таким образом, содержат по меньшей мере одну стабилизирующую мутацию в области F1 и/или F2, по сравнению с доменом F1 RSV и/или доменом F2 в F-белке RSV дикого типа. Известно, что RSV существуют в виде одного серотипа, имеющего две антигенные подгруппы: A и B. Аминокислотные последовательности зрелых процессированных F-белков двух групп являются идентичными приблизительно на 93%. Как используется во всей настоящей заявке, положения аминокислот приведены в отношении к последовательности F-белка RSV из штамма A2 (SEQ ID NO: 1). 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 A2 RSV с SEQ ID NO: 1. Необходимо отметить, что в системе нумерации, используемой в настоящей заявке, 1 относится к N-концевой аминокислоте незрелого FO-белка (SEQ ID NO: 1). Если штамм RSV отличается от используемого штамма A2, аминокислотные положения F-белка должны быть пронумерованы со ссылкой на нумерацию F-белка штамма A2 SEQ ID NO: 1 с помощью выравнивания последовательностей другого штамма RSV с F-белком с SEQ ID NO: 1 со вставкой гэпов, при необходимости. Выравнивание последовательностей можно выполнять с помощью способов, хорошо известных из уровня техники, например, с помощью

CLUSTALW, Bioedit или CLC Workbench.

Аминокислота в соответствии с настоящим изобретением может быть любой из двадцати природных (или 'стандартных' аминокислот) или их вариантов, таких как, например, D-аминокислоты (D-энантиомеры аминокислот с хиральным центром), или любыми вариантами, которые не встречаются в природе в белках, такими как, например, 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 более гибкий, чем другие аминокислоты. В табл. 17 представлены аббревиатуры 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 являются повышенные уровни экспрессии и/или повышенные уровни стабилизации F-полипептидов RSV перед слиянием по сравнению с F-полипептидами RSV, которые не содержат данную (данные) мутацию (мутации).

В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV перед слиянием являются полноразмерными.

В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV перед слиянием являются растворимыми.

В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV перед слиянием дополнительно содержат гетерологичный домен тримеризации, связанный с упомянутым усеченным доменом F1. В соответствии с настоящим изобретением было показано, что путем связывания гетерологичного тримеризационного домена с С-концевым аминокислотным остатком укороченной области F1, необязательно соединенной со связывающей последовательностью, которая связывает домены F1 и F2 и стабилизирующую мутацию (и), F-полипептиды RSV, при условии, что они проявили высокий уровень экспрессии и связаны со специфическими антителами перед слиянием, указывая, что полипептиды находятся в конформации перед слиянием. Кроме того, F-полипептиды RSV стабилизированы в конформации перед слиянием, т.е. даже после процессинга полипептидов они по-прежнему связаны со специфическими антителами CR9501 и/или CR9502 перед слиянием, указывая, что специфический эпитоп перед слиянием сохраняется.

В дополнительных вариантах осуществления F-полипептиды RSV перед слиянием содержат одну или несколько дополнительных мутаций (по сравнению с F-белком RSV дикого типа), выбранных 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 184;
- (f) мутации аминокислотного остатка в положении 185;
- (g) мутации аминокислотного остатка в положении 201;
- (h) мутации аминокислотного остатка в положении 209;
- (i) мутации аминокислотного остатка в положении 421;
- (j) мутации аминокислотного остатка в положении 426;
- (k) мутации аминокислотного остатка в положении 465;
- (l) мутации аминокислотного остатка в положении 486;
- (m) мутации аминокислотного остатка в положении 487 и
- (n) мутации аминокислотного остатка в положении 508.

В предпочтительных вариантах осуществления одна или несколько дополнительных мутаций выбраны из группы, состоящей из:

- (a) мутации аминокислотного остатка S в положении 46 в G (S46G);
- (b) мутации аминокислотного остатка K в положении 77 в E (K77E);
- (c) мутации аминокислотного остатка K в положении 80 в E (K80E);
- (d) мутации аминокислотного остатка E в положении 92 в D (E92D);
- (e) мутации аминокислотного остатка G в положении 184 в N (G184N);
- (f) мутации аминокислотного остатка V в положении 185 в N (V185N);
- (g) мутации аминокислотного остатка K в положении 201 в Q (K201Q);
- (h) мутации аминокислотного остатка K в положении 209 в Q (K209Q);
- (i) мутации аминокислотного остатка K в положении 421 в N (K421N);
- (j) мутации аминокислотного остатка N в положении 426 в S (N426S);
- (k) мутации аминокислотного остатка K в положении 465 в E или Q (K465Q);

- (l) мутации аминокислотного остатка D в положении 486 в N (D486N);
- (m) мутации аминокислотного остатка E в положении 487 в Q, N или I (E487Q/N/I) и
- (n) мутации аминокислотного остатка K в положении 508 в E (K508E).

Как описано выше, в некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV перед слиянием содержат мутацию в остатке D аминокислоты в положении 486 в C (D486C) в комбинации с D489C или E487C. Эти двойные мутации в двух дополнительных цистеиновых остатках приводят к дисульфидному мостику между субъединицами белков F1 с установлением ковалентной связи между протомерами и стабилизированием F-структуры RSV перед слиянием.

Снова необходимо отметить, что для положений аминокислотных остатков отсчет выполняется по отношению к SEQ ID NO: 1. Специалист сможет определить соответствующие аминокислотные остатки в F-белках других штаммов RSV.

В определенных вариантах осуществления F-полипептиды RSV перед слиянием содержат по меньшей мере две мутации (по сравнению с F-белком RSV дикого типа).

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 определенных вариантах осуществления гетерологичный домен тримеризации содержит аминокислотную последовательность EKKIEAIEKKIEAIEKKIEA (SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления гетерологичный домен тримеризации содержит аминокислотную последовательность GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 4).

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 вариантах осуществления домен F1 усекают после аминокислотного остатка 495 в F-белке RSV (обозначенного SEQ ID NO: 1), т.е. C-концевая часть домена F1, начиная с аминокислотного остатка 496 (обозначенного SEQ ID NO: 1) была удалена. В некоторых вариантах осуществления домен F1 усекают после аминокислотного остатка 513 в F-белке RSV. В некоторых вариантах осуществления домен F1 усекается после аминокислотного остатка 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524 или 525.

В некоторых вариантах осуществления домен тримеризации соединен с аминокислотным остатком 495 в F1-области RSV. В некоторых вариантах осуществления домен тримеризации содержит SEQ ID NO: 4 и связан с аминокислотным остатком 495 домена F1 RSV.

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: 3 и связан с аминокислотным остатком 513 домена F1 RSV.

Как описано выше, в некоторых вариантах осуществления домен F1, который является необязательно усеченным, а также домен F2 связаны связывающей последовательностью, которая связывает C-концевую аминокислоту домена F2 с N-концевой аминокислотой (необязательно усеченной) домена F2. В некоторых вариантах осуществления связывающая последовательность (или линкер) содержит от 1 до 10 аминокислотных остатков, предпочтительно от 2 до 9 аминокислотных остатков, предпочтительно от 3 до 8 аминокислотных остатков, предпочтительно от 4 до 7 аминокислотных остатков, более предпочтительно линкер содержит 5 или 6 аминокислотных остатков. Из уровня техники известны несколько конформационно нейтральных линкеров, которые можно использовать в соответствии с настоящим изобретением без нарушения конформации F-полипептидов RSV перед слиянием. В предпочтительных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность GSGSG (SEQ ID NO: 5).

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 в SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления домен F1 и/или домен F2 происходят из штамма A2 RSV в SEQ ID NO: 69.

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 в SEQ ID NO: 2.

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

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии F-полипептидов RSV перед слиянием настоящего изобретения повышен, по сравнению с эктодомом F-полипептида RSV дикого типа (т.е. без трансмембранного или цитоплазматического участка) без мутации (мутаций). В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии повышен по меньшей мере в 5 раз, предпочтительно до 10 раз. В не-

которых вариантах осуществления уровень экспрессии повышен более чем в 10 раз.

F-полипептиды RSV перед слиянием 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 перед слиянием 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. "Стабильный при хранении" означает, что полипептиды по-прежнему демонстрируют по меньшей мере один эпитоп, специфический для конкретных антител перед слиянием (например CR9501) при хранении полипептида в растворе (например, культуральной среде) при 4°C в течение, по меньшей мере 30 дней, например, как определено с использованием способа, описанного в примере 8 или 10. 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 перед слиянием термостабильны по меньшей мере 30 мин при температуре 55°C, предпочтительно при 58°C, более предпочтительно при 60°C. "Термостабильный" означает, что полипептиды по-прежнему демонстрируют по меньшей мере один специфический эпитоп перед слиянием после того, как их подвергали действию повышенной температуры по меньшей мере 30 мин (например, температуры 55°C или выше), например, как определено с использованием способа, описанного в примере 9.

В определенных вариантах осуществления полипептиды демонстрируют по меньшей мере один специфичный эпитоп перед слиянием после воздействия от 1 до 6 циклов замораживания-размораживания в приемлемом буферном составе.

В некоторых вариантах осуществления F-полипептид RSV перед слиянием по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 90-94. В определенных вариантах осуществления F-полипептид RSV перед слиянием по настоящему изобретению состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 90-94.

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

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: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 69. 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 (H) гистидина, часто на N- или С-конце белка, который обычно используют для целей очистки.

В определенных вариантах осуществления полипептиды не содержат HIS-метку. В соответствии с настоящим изобретением неожиданно было показано, что при удалении HIS-метки уровень экспрессии и стабильность повышаются по сравнению с полипептидами с HIS-меткой.

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 в <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 используются в оптимизированной по кодонам последовательности. Замещение предпочтительными кодонами, как правило, приводит к более высокому уровню 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, "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 содержать или могут не содержать интроны.

Последовательности нуклеиновых кислот можно клонировать с помощью стандартных методик молекулярной биологии или получать *de novo* с помощью синтеза ДНК, который можно проводить с использованием стандартных процедур при помощи 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. Такими векторами можно легко манипулировать с помощью способов, хорошо известных специалисту в данной области, и например, их можно сконструировать 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. Используемый вектор может представлять собой любой вектор, который подходит для клонирования ДНК и который можно использовать для транскрипции нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. Подходящими векторами в соответствии с настоящим изобретением являются, например, аденовекторы, такие как Ad26 или Ad35, 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 настоящего изобретения функциональным образом.

Клетки-хозяева, содержащие молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие F-полипептиды RSV перед слиянием, также составляют часть настоящего изобретения. F-полипептиды RSV перед слиянием 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 перед слиянием 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 разные промоторы можно использовать для обеспечения экспрессии гена в клетках-хозяевах. Промоторы могут быть конститутивными или регулируемыми, и их можно получать из разных источников, в том числе, вирусов, прокариотических или эукариотических источников, или получать 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 перед слиянием. Подходящая среда может содержать или может не содержать сыроворотку.

"Гетерологической 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(ы), 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 polyA гена бычьего гормона роста (патент США № 5122458) может располагаться позади трансгена(ов). В качестве альтернативы, несколько широко используемых векторов экспрессии доступны в данной области и их получают из коммерческих источников, например, серии векторов pcDNA 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 (см., 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 перед слиянием и/или молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор, как описано выше. Настоящее изобретение также представляет композиции, содержащие F-полипептид RSV перед слиянием, который демонстрирует эпитоп, присутствующий в конформации F-белка RSV перед слиянием, но отсутствует в конформации после слияния. Настоящее изобретение также представляет композиции, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор, кодирующие такой F-полипептид RSV перед слиянием. Настоящее изобретение также представляет иммуногенные композиции, содержащие F-полипептиды RSV перед слиянием и/или молекулу нуклеиновой кислоты, и/или вектор, как описано выше. Настоящее изобретение также представляет применение стабилизированного F-полипептида RSV перед слиянием, 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 к F-белку RSV, предусматривающие введение субъекту F-полипептида RSV до слияния и/или молекулу нуклеиновой кислоты, и/или вектор в соответствии с настоящим изобретением. Также представлены F-полипептиды RSV перед слиянием, 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 перед слиянием, 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 перед слиянием, молекулы нуклеиновой кислоты или векторы по настоящему изобретению можно использовать для предупреждения (профилактики) и/или для лечения инфекций RSV. В определенных вариантах осуществления профилактика и/или лечение могут быть направлены на группы пациентов, которые восприимчивы к RSV инфекции. Такие группы пациентов включают без ограничений, например, пожилых (например, ≥ 50 лет, ≥ 60 лет и предпочтительно ≥ 65 лет), молодых (например, ≤ 5 лет ≤ 1 лет), госпитализированных пациентов и пациентов, которые получали лечение противовирусными соединениями, но проявили недостаточный ответ на лечение противовирусными соединениями.

F-полипептиды RSV перед слиянием, 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 (существующие или будущие) 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 перед слиянием, 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 перед слиянием, 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, уменьшения 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, используемое в данном документе, может относиться к ослаблению видимых или заметных симптомов заболевания, вирусемии или любого другого заметного проявления инфекции RSV.

Для введения субъектам, таким как люди, в настоящем изобретении могут использоваться фармацевтические композиции, содержащие F-полипептид RSV перед слиянием, 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. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; а также 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 путем стерильной фильтрации или с помощью других способов, широко известных из уровня техники. Затем растворы лиофилизируют или расфасовывают по контейнерам, предназначенным для лекарственных форм. pH раствора обычно находится в диапазоне от pH 3,0 до pH 9,5, например, от pH 5,0 до pH 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, известные из уровня техники, дополнительно повышают иммунный ответ к применяемой антигенной детерминанте. 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 (см., например, WO 90/14837); составы с сапонидами, такие как, например, QS21 и иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS) (см., например, US 5057540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); производные бактерий или микроорганизмов, примерами которых являются монофосфорил липид A (MPL), 3-О-деацилированный MPL (3dMPL), олигонуклеотиды, содержащие мотив CpG, ADP-рибозилирующие токсины бактерий или их мутантные формы, такие как термолабильный энтеротоксин LT из *E. coli*, холерный токсин CT 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 из расчета на дозу.

F-полипептиды RSV перед слиянием можно также вводить в комбинации с наночастицами или конъюгированными с наночастицами, такими как, например, полимеры, липосомы, виросомы, вирус-подобные частицы. F-полипептиды перед слиянием 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 помещению 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, что приведет 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 перед слиянием и/или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей F-полипептид RSV перед слиянием 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 бронхолит у субъекта вследствие инфекции и репликации RSV. Выражение "вакцина" согласно настоящему изобретению подразумевает, что она представляет собой фармацевтическую композицию, и, таким образом, как правило, содержит 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 - 10 мкг, 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, мышшь, хлопкового хомяка или примата, кроме человека, или человека. Предпочтительно субъект представляет собой субъекта-человека.

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.

Кроме того, полипептиды по настоящему изобретению можно использовать в качестве диагностического средства, например, для проверки иммунного статуса индивидуума путем определения способности антител в сыворотке такого индивида к связыванию с полипептидами по настоящему изобретению. Настоящее изобретение также относится к *in vitro* диагностическому способу 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.

Настоящее изобретение относится также к способу стабилизации F-полипептида RSV в конформации перед слиянием, включающему внедрение в RSV домен F1 одной или нескольких мутаций, по сравнению с диким типом RSV домена F1, в котором выбирают одну или более мутаций из группы, состоящей из:

(а) стабилизирующей мутации в области HRA между элементами вторичной структуры в F перед слиянием, которые превращаются в одну большую суперспираль в F после слияния, а также

(б) интродукции двух остатков цистеина близко к 3-кольцевой оси в нижней части головки N-конца RSV-F перед слиянием по отношению к предварительно сшитому стеблю (остатки 493-525), N-концевых HRB), который сшивает ковалентной связью F1-субъединицы в тример.

В определенных вариантах осуществления мутация в области HRA находится в положении 161.

В определенных вариантах осуществления мутация в области HRA находится в положении 173.

В определенных вариантах осуществления мутация в области HRA находится в положении 182.

В определенных вариантах осуществления введение двух остатков цистеина находится в положении 486 и 489.

В определенных вариантах осуществления введение двух остатков цистеина находится в положении 486 и 487.

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

Далее настоящее изобретение поясняют следующими примерами. Данные примеры не ограничивают настоящее изобретение каким-либо образом. Они служат лишь для пояснения настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1. Получение стабильных F-полипептидов RSV перед слиянием - линкеры и домены тримеризации.

В совместно рассматриваемой заявке на патент PCT/EP2014/058353 стабилизированные варианты растворимого F-белка (sF) были разработаны путем стабилизации двух основных областей, которые инициируют повторную укладку. Первой стратегией было блокирование пептида слияния в его положении и предотвращение его высвобождения из головного участка путем фиксации и соединения доменов F1-F2 с помощью короткой петли. Высвобождение пептида слияния можно предотвратить с помощью перенесения ковалентного соединения N-конца F1 к C-концу F2. Как показано в этом примере, подвергли испытаниям ряд разных линкеров. Вставка 5-аминокислотной петли между F1 и F2, в частности, содержащей аминокислотную последовательность GSGSG (SEQ ID NO: 5), была наиболее успешной.

Другим нестабильным участком является второй гептадный повтор (HRB), который образует тримерный спиральный участок стебля в F-белке перед слиянием. Делеция трансмембранного домена (TM) в растворимом F-белке дополнительно дестабилизирует этот участок, что было восполнено добавлением различных гетерологических доменов тримеризации. Полностью процессированный зрелый эктодомен RSV-F сливали на C-конце с различными доменами тримеризации и в различных положениях (т.е. домен F1 усекали по различным аминокислотным остаткам).

Несколько конструкций получали на основе штаммов A2 или B1 RSV. Различные домены тримеризации связывали с доменом F1 RSV, который усекали по различным положениям. Домены тримеризации, которые исследовали, включали мотив фибритина (содержащий аминокислотную последовательность

GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 4), и мотив "фибритин длинный", более длинный, растянутый на N-конце домен фибритина, который содержит его встречающиеся в природе спиральные участки (содержащие аминокислотную последовательность

SSLQGDVQALQEAGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 6), которые добавляли к F1-домену RSV в рамке (в регистре) с предполагаемым гептадным повтором участка HRB.

Полученные дополнительные конструкции содержали гептадные идеальные спиральные тримерные суперспирали, или домен изолейциновой застежки (IZ) (Suzuki et al., Protein Engineering 11: 1051-1055 (1998)), содержащие аминокислотную последовательность

IEAIEKK (SEQ ID NO: 7).

В соответствии с настоящим изобретением использовали различные домены IZ, обозначенные как изолейциновая застежка (L), содержащая аминокислотную последовательность

(I) EKKIEAIEKKIEAIEKKIEAIEAIEKKIEA (SEQ ID NO: 8), и

изолейциновая застежка (S), содержащая аминокислотную последовательность

EKKIEAIEKKIEAIEKKIEA (SEQ ID NO: 3).

Эти домены IZ сопоставимы по структуре с GCN4, однако, домены IZ не являются природными последовательностями, а сконструированы для того, чтобы быть оптимальными доменами тримеризации, и поэтому более стабильными.

Дополнительные конструкции получали с другими известными доменами тримеризации:

GCN4II

EDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEA (SEQ ID NO: 9)

Оптимизированный GCN4II

EDKVEELLSKIYHIENRIARIEKLVGEA (SEQ ID NO: 10)

Матриллин -1 (длинная версия)

EEDPCECKSIVKFKTKVEELINTLQOKLEAVAKRIEALENKII (SEQ ID NO: 11)

Матриллин - 1 короткая версия, которая содержит только домен застежки:

EELINTLQOKLEAVAKRIEALENKII (SEQ ID NO: 12)

Получали следующие конструкции:

конструкция F18 содержала домен тримеризации фибритина (SEQ ID NO: 4), связанный с аминокислотным остатком 513 домена F1.

Конструкция F19 содержала домен тримеризации фибритина (SEQ ID NO: 4), связанный с аминокислотным остатком 499 домена F1.

Конструкция F20 содержала домен изолейциновой застежки (L) (SEQ ID NO: 8), связанный с аминокислотным остатком 516 домена F1 и содержащий дополнительные модификации в HRB для оптимизации гидрофобной природы гептадных положений и облегчения слияния с доменом IZ с сохранением

рамки считывания.

Конструкция F21 также содержала домен изолейциновой застежки (L) (SEQ ID NO: 8), но связанный с аминокислотным остатком 501 домена F1 и без дополнительных модификаций в 32 участке HRB.

Конструкция F22 содержала домен изолейциновой застежки (L) (SEQ ID NO: 8), связанный с аминокислотным остатком 495 домена F1 и содержащий дополнительные модификации в HRB.

Конструкция F23 содержала домен изолейциновой застежки (S) (SEQ ID NO: 3), связанный с аминокислотным остатком 495.

Конструкция F46 содержала домен изолейциновой застежки (S) (SEQ ID NO: 3), но связанный с более длинным эктодоменом RSV-F, т.е. домен F1 усекали после аминокислотного остатка 513.

Все конструкции содержали His-метку.

Конструкции исследовали в отношении уровней экспрессии, стабильности при хранении и связывания с антителом CR9501. Аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи и CDR тяжелой и легкой цепи этого антитела приведены ниже. CR9501 содержит связывающие участки антител, обозначенных как 58C5 в WO2012/006596.

Конструкции синтезировали и оптимизировали по кодам в Gene Art (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния). Конструкции клонировали в pCDNA2004 или создавали при помощи стандартных способов, широко известных в данной области, включая сайт-направленный мутагенез и ПЦР, и секвенировали. Используемой системой экспрессии были клетки 293Freestyle (Life

Technologies). Клетки временно трансфицировали с помощью 293Fectin (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя и культивировали в течение 5 дней при 37°C и 10% CO₂. Супернатант культуры собирали и центрифугировали в течение 5 мин при 300 g для удаления клеток и клеточного дебриса. Отцентрифугированный супернатант затем фильтровали в стерильных условиях с помощью 0,22 мкм вакуумного фильтра и хранили при 4°C до использования.

Супернатанты с 5 дня оценивали в отношении экспрессии F-белка с помощью вестерн-блоттинга, используя моноклональное антитело CR9503, которое содержит переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела к F RSV мотавизумаб (обозначенного как CR9503). Приблизительные уровни экспрессии конструкций F-белка RSV перед слиянием определяли с использованием CR9503, вторичного антитела, конъюгированного с IR-красителем, к иммуноглобулину человека (Li-Cor, Линкольн, Небраска) или HRP-конъюгированного мышиного антитела к IgG человека (Jackson ImmunoResearch, Вест Гров, Пенсильвания). Затем определяли количества белка с помощью серии разбавлений очищенного стандартного белка RSV, или визуально на глаз, или с использованием системы Odyssey CLx для инфракрасной визуализации. Для определения стабильности конструкций и выявления положительных или отрицательных стабилизирующих эффектов введенных мотивов тримеризации, конструкции, способные к связыванию с CR9501, обрабатывали в диапазоне температур от 45 до 65°C в течение 30 мин для исследования стабильности эпитопа CR9501. Эта процедура подробно описана в примере 9. Результаты обобщены в табл. 1.

Таблица 1. Экспрессия и стабильность конструкций F RSV с различными мотивами тримеризации

Белок RSV	Описание				Стабильность *
	Мотив тримеризации	Модификации	Точка терминации	Экспрессия (мкг/мл)	
F18	Фибритин	Отсутствуют	513	2	Нестабильный
F19	Фибритин	Отсутствуют	499	0	ND
F20	Изолейциновая застежка (L)	502 509 516 Ile	516	0	ND
F21	Изолейциновая застежка (L)	Отсутствуют	501	0	ND
F22	Изолейциновая застежка (L)	K483E + E488K	495	0	ND
F23	Изолейциновая застежка (S)	Отсутствуют	495	0,3 ¹	стабильный
F46	Изолейциновая застежка (S)	Отсутствуют	513	Не экспрессировал	ND

*Стабильность определяли, как описано в примере 8; ND: не определено.

1. Уровень экспрессии определяли с помощью вестерн-блоттинга, как описано в примере 1.

Как можно увидеть в табл. 1, единственными конструкциями, которые экспрессировались, были варианты фибритина (F18) и F23. Несмотря на то, что F18 был тримерным и демонстрировал экспрессию, он был нестабильным при хранении при 4°C. В противоположность этому, F23 был стабильным при 4°C, связывался со специфичными антителами перед слиянием, но, по-видимому, был мономерным. Таким образом, оба варианта F18 и F23 использовали для оптимизации стабильности и тримеризации.

Затем получали несколько конструкций, в которых пептид слияния на N-конце F1 был прикреплен путем слияния с C-концом домена F2. Все конструкции содержали His-метку.

Получали несколько конструкций, в том числе конструкции, в которых сайты расщепления фурином подвергали мутации, что приводило к образованию растворимого F-белка, который по-прежнему содержал пептид p27 (т.е. F12, F15.1 и F17). В других конструкциях область остатка 27 (петля P27), которая отщепляется от предшественника F0, была заменена альтернативным замкнутым контуром: либо путем замены области RSV-F на "гомологичную" область F PIV-5 F-белка перед слиянием, которая была произведена и успешно кристаллизована (F25), или путем замены области с помощью очень маленькой (GS)_n петли, которая будет связывать перемишкой концы F2 и F1 (F24), или же путем замены участка центральной консервативной области PCB-G (F26). Моделирование гомологии RSV-F на основе PIV-5 и измерений *in silico* привело в результате к выбору минимальной петли из 5 аминокислотных остатков между остатками 108 и 136. В качестве линкера выбирали остатки Gly (G) и Ser (S), которые являются гибкими и полярными и имеют высокую вероятность быть внесенными (F24). Кроме того, F137 подвергали мутации в S, поскольку локальные модификации, вызванные петлей, могли смещать гидрофобный F и вызывать нестабильности. Это представлено ниже. Также R106 подвергали мутированию в Q и заменяли 27 остатков (109-135), используя GSGSG.

PAANNRAREAPQYMN~~Y~~TINTTKNLNVSISKRR₁₃₆FLGFLLGVG

PAANNQAR GSGSGR₁₃₆SLGFLLGVG

Как представлено в табл. 2, все варианты не демонстрировали экспрессию или демонстрировали очень низкую экспрессию, за исключением варианта с короткой петлей GSGSG (F24), которая демонстрировала намного более высокую экспрессию (44 мкг/мл) по сравнению с конструкцией на основе F дикого типа RSV, т.е. подобной конструкцией, но без указанного линкера (F11). F24, который являлся тримерным, был, однако, нестабильным при хранении подобно всем другим вариантам с С-концевым мотивом тримеризации фибритина. Все варианты содержали HIS-метку.

Таблица 2. Экспрессия и стабильность конструкций на основе F RSV с различными линкерами F1-F2

Белок RSV	Вариант	Описание					Стабильность *
		Мотив тримеризации	Линкер F1, F2	Модификации	Точка терминации	Экспрессия (мкг/мл)	
F11	B1	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	513	2, 5	стабильный
F18	B1	фибритин	Отсутствуют	Отсутствует	513	2	нестабильный
F12	B1	фибритин	p27	КО сайта для фурина	513	0, 1	нестабильный
F15.1	B1	Отсутствует	p27	КО сайта для фурина	525	0, 5	ND
F17	A2	фибритин	p27	КО сайта для фурина	513	0	ND
F24	B1	фибритин	Q__GSGSG_S	Отсутствует	513	44	нестабильный
F25	B1	фибритин	PIV	Отсутствует	513	0	ND
F26	B1	фибритин	G CR	Отсутствует	513	0	ND

*Стабильность определяли, как описано в примере 8. Уровень экспрессии определяли, как описано в примере 1.

Затем наиболее подходящие модификации комбинировали для поиска оптимальных F-полипептидов перед слиянием. Комбинации получали из вариантов с петлей GSGSG, С-концевым усечением F1 и добавлением мотива фибритина (SEQ ID NO: 4) или изолейциновой застёжки (S) (SEQ ID NO: 3) (см. табл. 3).

Экспрессия и стабильность конструкций на основе F RSV с комбинациями оптимизаций согласно табл. 1 и 2

Таблица 3

Белок RSV	Вариант	Точка терминации	Описание			Стабильность эпитопа CR9501)	
			Мотив тримеризации	Линкер F1, F2	(мкг/мл)	Термоста- бильность (°C)	Хранение
F11	B1	513	Отсутствует	Отсутствует	2, 5	48	Стабильный
F23	B1	495	Изолейциновая застёжка (S)	Отсутствуют	0, 3	ND	Стабильный
F24	B1	513	Фибритин	Q_GSGSG_S	44	51	Нестабильный
F45	B1	495	Фибритин	Отсутствуют	0	ND	ND
F44	B1	495	Фибритин	Q_GSGSG_S	0	ND	ND
F49	B1	495	Отсутствует	Отсутствует	2	ND	Стабильный
F50	A2	495	Отсутствует	Отсутствует	2	ND	Стабильный
F43	B1	495	Изолейциновая застёжка (S)	Q_GSGSG_S	0, 4	53	Стабильный
F47	A2	495	Изолейциновая застёжка (S)	Q_GSGSG_S	5	52	Стабильный
F56	B1	513	Изолейциновая застёжка (S)	Q_GSGSG_S	0, 4	ND	Стабильный
F46	B1	513	Изолейциновая застёжка (S)	Отсутствуют	0	ND	Нестабильный
F42	B1	513	Отсутствует	Q_GSGSG_S	20	54	Стабильный
F57	A2	513	Отсутствует	Q_GSGSG_S	2-10	54	Стабильный

ND - не определено.

*Стабильность при хранении, как определяли в примере 8. *Термостабильность, как определяли в примере 9. Уровень экспрессии определяли с помощью вестерн-блоттинга (описано в примере 1).

Добавление петли GSGSG всегда повышало экспрессию функциональных конструкций, а также термостабильность белка. Комбинация петли GSGSG с усеченным F и мотивом изолейциновой застёжки (S) (F43, F47) продемонстрировала высокую экспрессию, термостабильность и значительную стабильность в хранении при 4°C. Однако эти варианты были по-прежнему мономерными. Мотив тримеризации с изолейциновой застёжкой (S) демонстрировал более высокую экспрессию с вариантом F, который представлял собой F, усеченный на С-конце в положении 495 (сравните F43 с F56 и F23 с F46). В противоположность этому, для вариантов с доменом тримеризации фибритина усечение в положении 513 продемонстрировало высокую экспрессию по сравнению с усечением в положении 495, которое не демонстрировало экспрессии (сравните F24 с F44).

Поскольку HIS-метка могла нарушать нативный фолдинг тримеров, то конструировали варианты без HIS-метки для фибритина и вариант изолейциновой застёжки (S) (табл. 4).

Таблица 4. Экспрессия и стабильность конструкций на основе F RSV с HIS-меткой и без HIS-метки

Белок RSV	Вариант	Мотив тримеризации	Линкер F1, F2	Точка терминации	Экспрессия мкг/мл	% тримеризации	Термоста- бильность (°C)	Хранение	Метки
F24	B1	Фибритин	Q_GSGSG_S	513	44	Тримерный (SEC)	51	нестабильный	HIS-метка
F24-	B1	Фибритин	Q_GSGSG_S	513	55	100% (нативный)	ND	нестабильный	Отсутствует
F47	A2	Изолей-циновая застёжка (S)	Q_GSGSG_S	495	5	0% (Odyssey)	52	стабильный	HIS-метка
F47-	A2	Изолей-циновая застёжка (S)	Q_GSGSG_S	495	10	2-5% (Odyssey)	53	стабильный	Отсутствует
A2_F24	A2	Фибритин	Q_GSGSG_S	513	5, 3	Тримерный (нативный)	48, 75	нестабильный	Отсутствует

*Стабильность при хранении определяли, как описано в примере 8; термостабильность определяли, как описано в примере 9; Н.о.: не определено.

Удивительным являлось то, что делеция HIS-метки повышала экспрессию в F47. Более того, для F47 она немного повышала содержание тримеров и для F24 она умеренно повышала только уровень экспрессии.

Затем, изучали несколько альтернативных доменов тримеризации и усечений в комбинации со стабилизированным петлей GSGSG вариантом F (F47) (см. табл. 5). Все варианты имеют петлю GSGSG и содержат HIS-метку.

Таблица 5. Экспрессия и стабильность вариантов на основе F RSV с альтернативными доменами тримеризации

Белок RSV	Вариант	Описание				Экспрессия тримеризации	Связывание антитела	
		Мотив тримеризации	Модификации	Точка терминации	Экспрессия (мкг/мл)		CR9501	CR9503
F47	A2	Изолейциновая застежка (S)	Отсутствуют	495	5	0%	+	+
F1	B1	Изолейциновая застежка (S)	S502T	502	3, 5	0%	+	+
Mat1	A2	Матриллин длинный	Отсутствует	520	12	три- и гексацимеры	-	+
Mat2	A2	Матриллин короткий	Отсутствует	516	0	ND	-	-
Mat3	A2	Матриллин короткий	Отсутствует	495	1, 5	ND	-	-
Оптимизированный GCN	A2	Оптимизированный GCN4II	Отсутствует	516	0	ND	-	-
Оптимизированный GCN+L512K	A2	Оптимизированный GCN4II	L512K	516	1	ND	+	-

Связывание антитела определяли, как связывание в день сбора клеток (как описано в примере 8; + указывает связывание; - указывает отсутствие связывания).

Уровень экспрессии определяли, как описано в примере 1. ND: не определено.

Только домен матрилина 1 (Dames-SA et. al., Nat. Struc. Biol., 5(8), 1998), который содержит и N-концевой домен застежки, и C-концевую часть с остатками цистеина, которые могут потенциально образовывать дисульфидные мостики между тримерами, как было обнаружено, способен к более высоким уровням экспрессии, чем F47 (табл. 5, матриллин длинный). Более того, вариант с мотивом тримеризации длинного матрилина демонстрирует тримерные F-белки. Продукт, однако, не связывался со специфическим Mab CR9501 перед слиянием и также демонстрировал гексамерные молекулы, которые делают домен тримеризации матрилина 1 не подходящим для получения тримерного нативного F-белка. Никакой из мотивов застежки на основе матрилина или на основе GCN4II не демонстрировал повышенной экспрессии или стабильности по отношению к F47 (табл. 5, матриллин короткий, GCN4II-оптимизированный). Снова усечение на 495 приводит к более высоким уровням экспрессии. Добавление мотива GCN4, который содержал оптимизированную триггерную последовательность, не продемонстрировало экспрессии.

GCN4 II представляет собой домен тримеризации, который успешно используют для стабилизации тримера вируса парагриппа типа 5 перед слиянием (Yin et al., Nature 439:38-44, 2006) и его испытывали другие для стабилизации F RSV перед слиянием (как раскрыто, например, в WO2010/149743, WO2010/14975, WO2009/079796, WO2010/158613). Домен тримеризации GCN4II оценивали и сравнивали с другими конструкциями, которые содержат домен изолейциновой застежки (S) (SEQ ID NO: 3) или домен фибритина (SEQ ID NO: 4) (результаты представлены в табл. 6). Эти варианты также сравнивали с другими модификациями, т.е. коротким линкером на основе одной мутации лизина и L512K. Все варианты содержали HIS-метку.

Таблица 6. Экспрессия и стабильность вариантов F RSV с замещением GCN4II, L512K и p27 (один аминокислотный линкер (K) между F1 и F2)

Белок RSV	Вариант	Описание					Стабильность	
		Мотив тримеризации	Линкер F1, F2	Модификации	Точка терминации	Экспрессия (мкг/мл)	Термоста- бильность (°C)	Хранение*
F18	B1	Фибритин	Отсутствуют	Отсутствует	513	2	ND	нестабильный
F24	B1	Фибритин	Q_GSGSG_S	Отсутствует	513	44	51	нестабильный
F43	B1	Изолейциновая застежка (S)	Q_GSGSG_S	Отсутствует	495	0,4	53	стабильный
P1	B1	Изолейциновая застежка (S)	Q_GSGSG_S	S502T	502	3,5	54	ND
F42	B1	Отсутствует	Q_GSGSG_S	Отсутствует	513	16,1	54	стабильный
P2	B1	Отсутствует	K	Отсутствует	513	14,3	54	стабильный
P3	B1	GCN4II	Отсутствует	L512K	516	0	ND	ND
P4	B1	GCN4II	K	L512K	516	0	ND	ND
P5	B1	GCN4II	K	L512K	516	0	ND	ND
P6	A2_I	GCN4II	K	L512K	516	0	ND	ND
P7	A2_II	GCN4II	K	L512K	516	0	ND	ND

Стабильность при хранении определяли, как описано в примере 8; уровни экспрессии определяли, как описано в примере 1; термостабильность определяли, как описано в примере 9; ND: не определено.

Короткая связь между F1 и F2, по-видимому, сопоставима с петлей GSGSG. Добавление мотива GCN4II не приводит в результате к какой-либо экспрессии F-белка в какой-либо из исследованных конструкций (т.е. ни в последовательности F RSV A2, описанной в WO2010/149743 или WO2010/149745, ни в последовательности A2 F вируса RSV, используемой в соответствии с настоящим изобретением, ни в последовательности B1 F вируса RSV).

Было показано, что введение этих двух типов модификаций, т.е. введение связывающей последовательности и гетерологического домена тримеризации, было недостаточно для обеспечения экспрессии стабильного тримерного F-белка перед слиянием. Помимо этих двух основных участков нестабильности, которые были стабилизированы, т.е. HRB и пептида слияния, как описано выше, другие участки в F-белке перед слиянием также способствуют значительному рефолдингу и/или вносят значительный рефолдинг в F после слияния, и можно оптимизировать больше положений в последовательности для остановки рефолдинга F-белка перед слиянием. Таким образом, разные аминокислотные остатки в домене HRA и HRB и во всех доменах, которые контактируют с этими участками в F перед слиянием, подвергали мутированию для повышения структурной стабильности перед слиянием, как описано в следующих примерах.

Пример 2. Получение стабильных F-полипептидов RSV перед слиянием стабилизирующие мутации.

Поскольку содержание тримеров (для конструкции F47) и стабильность при хранении (для конструкции F24) не были оптимальными, создавали дополнительные варианты, которые содержали точечные мутации для повышения уровней экспрессии, стабильности и нативной тримерной структуры. Результаты представлены в табл. 7 и 8.

Таблица 7. Экспрессия и стабильность F47- вариантов

Белок RSV	Экспрессия (мкг/мл)	% тримеризации	Термостабильность (°C)
F47-	10	2-5%	53
F47- + K465E	6	2,4%	ND
F47- + D479K	5	29%	50,77
F47- + K176M	13	5%	ND
F47- + K209Q	9	3%	52,9
F47- + S46G	38	11%	59,38
F47- + S215P	8	1-2%	57,21
F47- + N67I	15	2%	59,84
F47- + K465Q	18	2%	54,3
F47- S46G+N67I	31	6%	>60
F47- S46G+S215P	38	6%	>60
F47- K465Q+K209Q	12	1%	53,3
F47- K465Q+S46G	28	7%	57,7
F47- K465Q+N67I	17	2%	59
F47- K209Q+N67I	15	4%	>60
F47- K209Q+S215P	15	2%	56,7

ND: не определено; уровень экспрессии определяли, как описано в примере 1. Термостабильность определяли, как описано в примере 9.

Номенклатура мутаций на основе последовательности дикого типа (SEQ ID NO: 1).

Все конструкции являются вариантами F47- : тип A2, мотив изолейциновой застёжки (S) (SEQ ID NO: 3), линкер GSGSG; точка терминации 495, без HIS-метки (SEQ ID NO: 16). Как представлено в табл. 7, многие мутации повышали экспрессию F47-, но только вариант F47_S46G одновременно демонстрировал более высокий уровень тримеров, помимо высокой экспрессии.

В табл. 8 представлены результаты экспрессии и стабильности вариантов для F24. Все варианты представляли собой RSV типа A2, с мотивом фибритина, линкером GSGSG; точкой терминации 513, без HIS-метки.

Таблица 8. Экспрессия и стабильность вариантов A2_F24- (SEQ ID NO: 19)

Белок RSV	Экспрессия (мкг/мл)	Хранение	
		Конечная точка	Фаза ассоциации
A2_F24	5,3	69	ND
A2_F24 K508E	5,3	64	ND
A2_F24 K498E	1,7	ND	ND
A2_F24 E487I	25,0	10	ND
A2_F24 E487K	7,1	ND	ND
A2_F24 E487N	42,4	22	ND
A2_F24 E487P	12,8	46	ND
A2_F24 E487Q*	14,8	50	ND
A2_F24 E487R	8,7	59	ND
A2_F24 E487S	6,7	46	ND
A2_F24 E487Y	10,5	36	ND
A2_F24 D486N	31,2	19	ND
A2_F24 D479N	5,2	ND	ND
A2_F24 D479K	1,5	62	ND
A2_F24 E472Q	1,9	ND	ND
A2_F24 E472K	0,9	ND	ND
A2_F24 K465E	14,8	76	ND
A2_F24 K465Q*	13,6	92	Нестабильный
A2_F24 E463K	3,1	ND	ND
A2_F24 E463Q	6,0	ND	ND
A2_F24 G430S	4,8	ND	ND
A2_F24 N428R	5,2	35	ND
A2_F24 N426S	18,6	71	ND
A2_F24 K421N	9,2	75	ND
A2_F24 E328K	9,5	21	ND
A2_F24 T311S	3,5	70	ND
A2_F24 I309V	11,3	69	ND
A2_F24 D269V	0,0	ND	ND
A2_F24 S215P*	18,7	99	Стабильный

A2_F24 K209Q	31,4	63	ND
A2_F24 V207P	3,3	79	ND
A2_F24 I206P	5,4	55	ND
A2_F24 L204P	5,9	ND	ND
A2_F24 L203P	0,8	ND	ND
A2_F24 Q202P	4,4	ND	ND
A2_F24 K201Q	21,3	62	ND
A2_F24 D194P	1,9	ND	ND
A2_F24 L193P	6,5	42	ND
A2_F24 V192P	0,6	32	ND
A2_F24 V185N	50,2	38	ND
A2_F24 GV184EG	3,5	ND	ND
A2_F24 G184N	59,8	37	ND
A2_F24 V178P	14,8	23	ND
A2_F24 A177P	2,0	ND	ND
A2_F24 K176M	14,7	58	ND
A2_F24 K176E	0,7	ND	ND
A2_F24 N175P	34,3	55	ND
A2_F24 S169P	0,5	ND	ND
A2_F24 K168P	0,1	ND	ND
A2_F24 K166P	12,3	45	ND
A2_F24 V157P	0,2	ND	ND
A2_F24 E92D	47,4	94	Нестабильный
A2_F24 K85E	1,1	ND	ND
A2_F24 K80E	51,9	60	ND
A2_F24 K77E	22,4	ND	ND
A2_F24 N67I*	89,8	101	Стабильный
A2_F24 I57V		ND	ND
A2_F24 VI56IV	16,5	54	ND
A2_F24 S46G*	40,7	96	Нестабильный

Помеченные * конструкции подвергали тестированию в отношении тримеризации, и было установлено, что все являлись тримерными.

Уровень экспрессии определяли, как описано в примере 1. Стабильность конечного состояния показана здесь как процент связывания антитела (CR9501) перед сливанием после 5 дней хранения при 4°C по отношению к 1 дню; стабильность фазы ассоциации определяли, как описано в примере 10.

Многие мутации повышали экспрессию A2_F24-. Для большинства мутаций наблюдали видимую взаимосвязь между повышенной экспрессией на фоне F47- (табл. 7) и на фоне A2_F24- (табл. 8). N67I оказывала более положительное влияние на экспрессию F на фоне A2_F24-. Наиболее значимого повышения экспрессии достигали с использованием единичных точечных мутаций: S46G, S215P, N67I, K80E, E92D, D486N, G184N, V185N, E487N, N175P, K209Q, E487I, E487Q, K77E, K201Q, N426S и K465Q. При первичном скрининге с помощью анализа конечной стабильности (пример 8) варианты с наиболее высокой экспрессией также демонстрировали лучшую стабильность при хранении (E92D, K465Q, K465E, N426S, S46G, S215P и N67I). Для того чтобы оценить, действительно ли эти мутации стабилизируют конформацию перед сливанием, супернатанты культур разводили до 5 и 10 мкг/мл, исходя из результатов количественного вестерн-блоттинга, и их хранили до 33 дней при 4°C. В качестве точечных мутантов только N67I и S215P были полностью стабильны со временем (см. пример 10).

Затем несколько мутаций, которые демонстрировали высокую экспрессию и надлежащую стабильность конформации перед сливанием, комбинировали для того чтобы оценить, были ли стабилизации аддитивными или имели ли возможный синергетический эффект (табл. 9).

Таблица 9. Экспрессия и стабильность вариантов A2_F24 с двумя дополнительными мутациями

Белок RSV	Экспрессия (мкг/мл)	Стабильность *
A2_F24 K465Q + S46G	21,8	Нестабильный
A2_F24 K465Q + N67I	122,3	Стабильный
A2_F24 K465Q + E92D	10,5	Стабильный
A2_F24 K465Q + S215P	59,8	Стабильный
A2_F24 S46G + N67I	115,5	Стабильный

A2_F24 S46G + E92D	14,3	Нестабильный
A2_F24 N67I + E92D	134,2	Стабильный
A2_F24 N67I + S215P	152,1	Стабильный
A2_F24 E92D + S215P	49,1	Стабильный
A2_F24 K465Q+S215P	53,3	Стабильный
A2_F24 S46G+S215P	43,8	Стабильный

Стабильность при хранении относится к анализу фазы ассоциации, представленной в примере 10.

Уровень экспрессии определяли, как описано в примере 1.

Все варианты являлись вариантами F24-: A2 типа, мотив фибритина, линкер GSGSG; точка терминации 513, связывание со всеми Mab, без HIS-метки (SEQ ID NO: 19).

При комбинировании ранее выявленных точечных мутаций можно было наблюдать очень интересные синергетические эффекты в отношении уровней экспрессии с комбинациями, включающими N67I в качестве наиболее эффективной. Все полученные двойные мутанты, независимо от того была ли включена N67I или S215P, были стабильными спустя более 30 дней при хранении при 4°C (пример 10). Неожиданным образом, было установлено, мутация N67I оказывала наиболее сильный эффект на уровне экспрессии F перед слиянием при включении в двойные мутанты. Также комбинации с мутациями S215P приводили к умеренной экспрессии. Сочетание N67I с S215P выбрали, поскольку оно приводило к очень высокому уровню экспрессии, а также потому, что обе точечные мутации были стабильными при хранении. Кроме того, было отмечено, что N67I и S215P обладали способностью стабилизировать некоторые мутанты, которые в качестве единичных мутаций были нестабильными, указывая на то, что участок, где эти две мутации встречались, является центральным для конформационных изменений, которым подвергается белок во время перехода к конформации после слияния.

Таким образом, было показано, что по меньшей мере некоторые мутации приводили в результате к повышенным уровням экспрессии и повышенной стабилизации белка RSV перед слиянием.

Предполагается, что эти явления связаны. Мутации, описанные в этом примере, все в результате приводили к повышенному продуцированию F-полипептидов перед слиянием. Только выбранные из этих полипептидов оставались стабильными при длительном хранении (смотри пример 10). Используемый анализ стабильности основывается на потере специфического эпитопа CR9501 перед слиянием в верхней части F- перед слиянием в анализе связывания и он может быть недостаточно чувствительным для определения всех вкладов в стабильность всего белка. Мутации, для которых наблюдали только повышенную экспрессию, являются, таким образом (вероятно стабилизирующими), потенциальными мутациями, которые можно комбинировать с другими стабилизирующими мутациями для получения F-конструкции перед слиянием с высокой стабильностью и высокими уровнями экспрессии.

Затем проверяли, была ли способна двойная мутация N67I -S215P, подобно единичным мутациям, стабилизировать точечные мутации, которые, как единичные мутации считались нестабильными на основании использованных критериев. Выбирали дополнительные мутации на основе подходящих уровней экспрессии и стабильности в соответствии с табл. 8. Разрабатывали и исследовали в отношении уровней экспрессии и стабильности варианты тройных мутантных RSV-F (табл. 10).

Таблица 10. Экспрессия и стабильность вариантов F24 N67I +S215P с одной дополнительной мутацией

Белок RSV	Экспрессия (мкг/мл)	Стабильность *
A2_F24 N67I + S215P+K507E	344,6	++
A2_F24 N67I + S215P+E487I	239,4	+++
A2_F24 N67I + S215P+E487N	285,2	+++
A2_F24 N67I + S215P+E487Q	360,7	+++
A2_F24 N67I + S215P+E487R	130,9	+++
A2_F24 N67I + S215P+D486N	292,6	+++
A2_F24 N67I + S215P+D479N	97,1	+++
A2_F24 N67I + S215P+K465Q	283,3	+++
A2_F24 N67I + S215P+N426S	316,3	+++
A2_F24 N67I + S215P+K421N	288,4	+++
A2_F24 N67I + S215P+K209Q	245,0	+++
A2_F24 N67I + S215P+K201Q	231,9	+++
A2_F24 N67I + S215P+V185N	445,1	+++
A2_F24 N67I + S215P+G184N	326,7	+++
A2_F24 N67I + S215P+E92D	308,8	+
A2_F24 N67I + S215P+K80E	210,6	+
A2_F24 N67I + S215P+S46G	199,4	+++

Все варианты были вариантами A2_F24_N67I+S215P A2 типа, мотив фибритина, линкер GSGSG; точка терминации 513, связывание со всеми Mab, без HIS-метки (SEQ ID NO: 21).

*стабильность при хранении относится к анализу фазы ассоциации, представленной в примере 10.

+ означает <10% потерь связывания CR9501 за 5 дней; ++ означает <5% потерь связывания CR9501 за 5 дней; +++ означает 0% потерь связывания CR9501 за 5 дней.

Снова наблюдали аддитивный эффект в отношении уровней экспрессии. Как ожидалось, тройные мутанты D479N и E487R экспрессируют при несколько меньших уровнях, поскольку единичные мутанты также находились среди наиболее низких из выбранных мутаций (табл. 8). В связи со стабилизирующим эффектом мутации N67I+S215P, дополнительные мутации, которые являются нестабильными в качестве единичных мутаций, приводили к образованию стабильных вариантов F перед слиянием при добавлении к фону A2_F24 N67I+S215P. Некоторыми наиболее иллюстративными примерами являются тройные мутанты с дополнительной V185N, G184N или E487N, которые демонстрировали высокую экспрессию, но низкую стабильность в качестве единичных мутантов (табл. 8), но демонстрировали даже более высокую экспрессию и были высокостабильными при добавлении к фону A2_F24 N67I+S215P.

Стабилизирующие мутации также стабилизируют белок RSV-F из других штаммов и также в процессированном варианте F.

Некоторые мутации, которые показали высокий уровень экспрессии и хорошую стабильность конформации перед слиянием, применяли к F-белкам RSV других штаммов и применяли к A2-варианту F вируса RSV без мутаций сайта расщепления фурина (F18: SEQ ID NO: 71) для оценки, являются ли модификации универсальным решением для стабилизации F RSV перед слиянием (табл. 11).

Таблица 11. Экспрессия и стабильность вариантов A2_F18 с дополнительными мутациями и F из штамма B1 (SEQ ID NO: 2) и CL57-v224 типа A (SEQ ID NO: 69)

Белок RSV	Seq ID	Относительная* экспрессия (CR9503)	Стабильность** через 5 дней, %
A2_F18	71	0,018	0,0
A2_F18 N67I		0,449	73,2
A2_F18 S215P		0,129	9,1
A2_F18 E487Q		0,006	NA
A2_F18 N67I, S215P	72	0,484	103,4
A2_F18 N67I, E487Q		0,340	92,1
A2_F18 N67I, S215P, E487Q	76	0,355	92,7
A2_F18 N67I, S215P, E92D	78	0,318	96,0
A2_F18 N67I, S215P, D486N	79	0,522	101,3
A2_F18 N67I, S215P, K201N	77	0,643	102,7
A2_F18 N67I, S215P, K66E		0,800	103,0
A2_F18 N67I, S215P, S46G, K66E		0,820	103,5
A2_F18 N67I, S215P, E487Q, K66E		0,704	99,5
A2_F18 N67I, S215P, E92D, K66E		0,905	98,8
A2_F18 N67I, S215P, D486N, K66E		0,863	96,6
A2_F18 N67I, S215P, K201N, K66E		1,021	105,5
A2_F18 N67I, S215P, D486N, K66E, I76V		0,594	95,0
B1_N67I, S215P	73	0,434	90,9
B1_N67I, S215P петлевой	22	0,552	108,2
CL57v224_N67I, S215P	74	0,698	94,9
CL57v224_N67I, S215P петлевой	75	0,615	98,4

Экспрессию белка (концентрацию в супернатанте временно трансфицированных клеток) определяли с помощью количественной методики Octet.

* Относительная экспрессия нормализована к экспрессии A2_F24_N67I, S215P, E487Q (seq ID #33)

** Стабильность - выражают в виде % концентрации белка, определенного после хранения при 4°C в течение 5 дней, относительно дня сбора клеток. Концентрации измеряли

количественной методикой Octet, используя антитело CR9501. NA -данные не доступны: не обнаружено никакого связывания CR9501.

Когда ранее идентифицированные точечные мутации были введены в A2_F18 (SEQ ID NO. 71), стабильность и уровни экспрессии были очень схожи, по сравнению с одноцепочечным F24 (SEQ ID NO. 21) вариантом, который содержал короткую петлю между F1 и F2. Снова наблюдали синергизм, демонстрируя более высокую экспрессию и стабильность при добавлении мутаций к вариантам, которые содержали N67I или двойную мутацию N67I, S215P. Двойная точечная мутация N67I, S215P не только стабилизировала F перед слиянием штамма A2, но также F перед слиянием штамма B1 и CL57-v224 (табл. 11).

Стабилизирующие мутации также стабилизируют полноразмерный белок RSV-F.

Несколько мутаций, которые демонстрировали высокую экспрессию и значительную стабильность конформации перед слиянием в растворимой версии RSV-F, соответствующей эктодомену, использовали по отношению к полноразмерному белку RSV-F. Мутации вводили в полноразмерный RSV-F с наличием или без мутаций в сайте отщепления фурином. К этим вариантам не были присоединены никакие домены тримеризации (табл. 12).

Таблица 12. Экспрессия и стабильность вариантов полноразмерных версий A2_F18 и A2_F24 с дополнительными мутациями

Аминокислотные замены	Вариант F-белка RSV*		Свойства	
	SEQ ID No	Линкер F1, F2	Экспрессия, кратность увеличения**	Термостабильность***
Нет (F A2 дикого типа, полноразмерный)	1	отсутствует	1	-
N67I		отсутствует	1,4	N.D.
S215P		отсутствует	1,4	N.D.
E92D		отсутствует	1,4	N.D.
N67I, K465Q		отсутствует	1,4	N.D.
N67I, S46G		отсутствует	0,2	N.D.
N67I, E92D		отсутствует	1,4	N.D.
N67I, K80E		отсутствует	2,3	N.D.
N67I, G184N		отсутствует	1,5	N.D.
N67I, V185N		отсутствует	1,4	N.D.
N67I, E487Q		отсутствует	2,5	N.D.
N67I, S215P, V185N		отсутствует	2,7	N.D.
N67I, S215P, K508E		отсутствует	3,0	N.D.
N67I, S215P, K80E		отсутствует	3,1	N.D.
N67I, S215P, K465Q		отсутствует	2,9	N.D.
N67I, S215P	80	отсутствует	2,4	++
N67I, S215P, G184N		отсутствует	7,6	++
N67I, S215P, E92D	82	отсутствует	6,8	N.D.
N67I, S215P, S46G	88	отсутствует	6,8	+
N67I, S215P, D486N	86	отсутствует	5,9	+++
N67I, S215P, E487Q	84	отсутствует	6,2	N.D.
N67I, S215P, S46G, K66E		отсутствует	12,1	+++
N67I, S215P, D486N, K66E		отсутствует	9,2	+++
N67I, S215P, S46G, E92D, K66E		отсутствует	11,8	+++
N67I, S215P, S46G, E487Q, K66E		отсутствует	11,0	+++
N67I, S215P, S46G, D486N, K66E		отсутствует	10,5	+++
N67I, S215P, D486N, K66E, I76V		отсутствует	7,2	+++
N67I, S215P, S46G, K66E, I76V		отсутствует	9,7	+++
N67I, S215P, S46G, K80E		отсутствует	4,5	N.D.
N67I+S215P+G184N+K80E+E92D+E487Q+S46G		отсутствует	9,1	N.D.
Отсутствует		Q_GSGSG_S	3,8	-
N67I, S215P	81	Q_GSGSG_S	6,2	N.D.
N67I, S215P, G184N		Q_GSGSG_S	7,2	++
N67I, S215P, E92D	83	Q_GSGSG_S	5,9	N.D.
N67I, S215P, S46G	89	Q_GSGSG_S	5,3	++
N67I, S215P, D486N	87	Q_GSGSG_S	5,2	+++
N67I, S215P, E487Q	85	Q_GSGSG_S	4,6	N.D.

N67I, S215P, S46G, K66E		Q__GSGSG_S	11,7	+++
N67I, S215P, D486N, K66E		Q__GSGSG_S	13,8	+++
N67I, S215P, D486N, K66E, I76V		Q__GSGSG_S	6,8	+++
N67I+S215P+G184N+K80E+E92D+E487Q+S46G		Q__GSGSG_S	3,6	N.D.

Уровень экспрессии определяли с помощью FACS. N.D. - не определено.

*все варианты основаны на последовательности F-белка RSV A2.

** по сравнению с белком дикого типа кратность увеличения MFI в отношении 9503.

Стабильность определяли с помощью тепловой обработки клеток НЕК293Т в течение 5-10 мин при 46, 55, 3, 60°C.

*** обозначение для данных стабильности.

- снижение связывания к специфическому Mab CR9501 перед слиянием, после нагревания до 46°C (например, дикого типа).

+ небольшое снижение связывания CR9501 после нагревания до 46°C, но не в той же степени, как дикого типа.

++ никаких изменений в связывании CR9501 после нагревания до 60°C, при 60°C небольшое снижение в связывании CR9501.

+++ никаких изменений в связывании CR9501 после нагревания до 60°C.

Ранее выявленные стабилизирующие точечные мутации также были стабилизирующими в полном размере F-белке. Повышение уровня экспрессии было менее выраженным, но демонстрировало ту же тенденцию. Это может быть вызвано различным фоном, при котором вводили мутации, но причина может также быть в различной методике количественной оценки (FACS по сравнению с вестерн-блоттингом) и биологическим максимумом экспрессии вследствие рециклинга поверхностных белков. Введение связывающей

последовательности (или короткой петли) повышало экспрессию и стабильность, и точечные мутации оказывали то же действие. Точечные мутации не были или вряд ли были синергетическими с короткой петлей (подобно тому, как было обнаружено для растворимого белка (табл. 9-11).

Поскольку точечная мутация в положении 67 оказывала такой положительный эффект в отношении уровня экспрессии и стабильности, все аминокислотные замены исследовали в отношении этого положения для изучения того, были ли выбраны наиболее оптимальные положения или можно было бы улучшить эти положения (табл. 13).

Таблица 13. Анализ полной замены экспрессии и стабильности для положения 67 на фоне A2 F24

Аминокислотная замена	Относительная экспрессия*	Стабильность** через 4 дня, %	Стабильность** через 10 дня, %
N67A	1,696	0,0	0,0
N67C	1,759	16,7	0,0
N67D	1,702	0,0	0,0
N67E	1,357	0,0	0,0
N67F	2,565	102,2	108,1
N67G	0,853	NA	NA
N67H	1,509	0,0	0,0
N67I	3,773	98,2	102,7
N67K	0,487	NA	NA
N67L	3,609	107,5	96,4
N67M	2,579	87,3	78,7
N67P	2,414	14,3	0,0
N67Q	0,955	NA	NA
N67R	0,523	NA	NA
N67S	1,277	0,0	0,0
N67T	1,577	0,0	0,0
N67V	2,457	84,2	77,0
N67W	1,794	99,9	104,3
N67Y	1,830	61,3	45,8

* Относительная экспрессия - концентрацию белка измеряли количественной методикой Octet с использованием антитела CR9503, и выражали по отношению к концентрации A2_F24 (SEQ ID #19)

** Стабильность - выражают в виде % концентрации белка, определенного после хранения при 4°C в течение 5 и 10 дней, относительно дня сбора клеток. Концентрации измеряли количественной методи-

кой Octet, используя антитело CR9501. NA - данные не доступны: не обнаружено никакого связывания CR9501.

Как представлено в табл. 13, преимущественно гидрофобные остатки и, в частности, Ile, Leu и Met в положении 67 могли повышать экспрессию и стабильности. Не представляет собой остаток, который в наибольшей степени повышал экспрессию и стабильность. Остатки Glu и Gln, самый маленький остаток Gly и положительно заряженные остатки Arg и Lys обладали наибольшим дестабилизирующим эффектом в положении 67 в отношении конформации перед слиянием.

Пример 3. Приготовление стабильных F-полипептидов RSV перед слиянием в соответствии с настоящим изобретением.

В исследовании, которое привело к данному изобретению, дополнительно стабилизированные варианты растворимого F-белка (sF) перед слиянием были разработаны посредством стабилизирования двух основных областей, которые иницируют повторную укладку. Первая стратегия заключается в предотвращении повторной укладки области HRA в суперспираль. Вторая стратегия заключалась в построении дисульфидных мостиков N-концевой части HRB для предотвращения перемещения HRB с целью формирования связки из шести спиралей путем докинга на суперспираль HRA.

Конструкции исследовали в отношении уровней экспрессии, стабильности при хранении и связывания с антителом CR9501. Аминокислотные последовательности варьируемых участков тяжелой и легкой цепи и CDR тяжелой и легкой цепи этого антитела приведены ниже. CR9501 содержит связывающие участки антител, обозначенных как 58C5 в WO2012/006596.

Конструкции синтезировали и оптимизировали по кодонам в Gene Art (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния). Конструкции клонировали в pCDNA2004 или создавали при помощи стандартных способов, широко известных в данной области, включая сайт-направленный мутагенез и ПЦР, и секвенировали. Используемой системой экспрессии были клетки 293Freestyle (Life Technologies). Клетки временно трансфицировали с помощью 293Fectin (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя и культивировали в течение 5 дней при 37°C и 10% CO₂. Супернатант культуры собирали и центрифугировали в течение 5 минут при 300 g для удаления клеток и клеточного дебриса. Отцентрифугированный супернатант затем фильтровали в стерильных условиях с помощью 0,22 мкм вакуумного фильтра и хранили при 4°C до использования.

Супернатанты с 5 дня оценивали в отношении экспрессии F-белка с помощью вестерн-блоттинга, используя моноклональное антитело CR9503, которое содержит варьируемые участки тяжелой и легкой цепи антитела к F RSV мотавизумаб (обозначенного как CR9503). Приблизительные уровни экспрессии конструкций F-белка RSV перед слиянием определяли с использованием CR9503, вторичного антитела, конъюгированного с IR-красителем, к иммуноглобулину человека (Li-Cor, Линкольн, Небраска) или HRP-конъюгированного мышинного антитела к IgG человека (Jackson ImmunoResearch, Вест Гров, Пенсильвания). Затем определяли количества белка с помощью серии разбавлений очищенного стандартного белка RSV, или визуально на глаз, или с использованием системы Odyssey CLx для инфракрасной визуализации. Чтобы оценить стабильность конструкции и определить положительные или отрицательные стабилизирующие эффекты введенных мотивов тримеризации, конструкции были протестированы на связывание со специфическим антителом перед слиянием после 5, 14 или 30 дней хранения при 4°C. Эта процедура подробно описана в примере 10.

Затем, наиболее подходящие модификации комбинировали для поиска оптимальных F-полипептидов перед слиянием. Комбинации получили из вариантов с петлей GSGSG, C-концевым усечением F1 и добавлением фибритина (SEQ ID NO: 4). Получили варианты, которые содержали точечные мутации, с целью увеличения уровней экспрессии, стабильность и нативную тримерную структуру. Все варианты представляли собой RSV типа A2, с мотивом фибритина, линкером GSGSG; точкой терминации 513, без HIS-метки.

В соответствии с настоящим изобретением мутации аминокислот, которые стабилизируют конформацию F-белка RSV перед слиянием, можно группировать в различные категории, которые стабилизируют конформацию различным образом.

Аминокислотные остатки 161, 173, 174, 182 и 214.

Для рефолдинга из конформации перед слиянием в конформацию после слияния участок между остатком 160 и 215 необходимо преобразовать из сборки спиралей, петель и нитей в длинную непрерывную спираль. Этот участок демонстрирует наиболее существенный структурный переход. Часть этого участка фактически имеет наиболее высокую степень прогнозирования образования альфа-спирали. Фактические спиральные структуры в модели перед слиянием представлены ниже выделением серого цвета. Весь данный участок преобразуется в одну большую спираль, когда он подвергается рефолдингу в конформацию после слияния. В нижней последовательности остатки выделены серым цветом с наиболее высокой степенью прогнозирования образования спирали на основе Agadir (<http://agadir.crg.es/>). Из этого сравнения ясно, что C-концевая часть, которая содержится в бета-шпильке, соединительная петля и спираль в конформации перед слиянием (остатки 187-202), имеет высокую тенденцию образовывать альфа-64 спирали.

150 160 170 180 190 200 210

SGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLN~~SGVSVLTSKVLD~~DLKNYIDKQLLP~~IVN~~

KQSC

Hhhhhhhh hhhhhhhhhh ssssss ssssss hhhh hhhh

SGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLN~~SGVSVLTSKVLD~~DLKNYIDKQLLP~~IVN~~

KQSC

Подчеркнутые остатки имеют плохие углы, согласно карте Рамачандрана.

Последовательность остатков 150-212 RSV-F представлена выше. Во второй строке вторичные структуры верхней строки обозначены h (для спирали) и s (для нитей) на основе кристаллической структуры. Спираль выделены серым затенением. Нижняя строка является той же самой последовательностью, в которой спирали затенены серым цветом на основе свойств спирали последовательности.

Области, которые нужно оптимизировать, являются участками петель между вторичными структурными элементами (спирали и нити) в лабильной HRA белка RSV-F перед слиянием.

Одно из положений в HRA, которое нуждается в оптимизации с целью стабилизации конформации RSV-F перед слиянием, является положением 161 в витке между спиралями $\alpha 2$ (остатки 148-157) и $\alpha 3$ (остатки 163-172). Есть несколько причин, почему оптимизация этого положения может повысить стабильность этой области:

отрицательный заряд положений витков Glu161 близок к отрицательному заряду Glu163, что приводит к дестабилизирующему отрицательному отталкиванию;

карта Рамачандрана показывает, что остаток 161 имеет плохие/неблагоприятные диэдральные углы;

остаток 161 имеет высокий B-фактор, который отражает высокую мобильность (и предполагает нестабильность);

остатки 160-172 проявляют высокую склонность к спирализации.

В этом примере остаток Glu161 заменили Pro, чтобы уменьшить отрицательное отталкивание, стабилизировать виток и предотвратить его повторную укладку, или остаток Glu161 заменили Gln, чтобы уменьшить отталкивание отрицательного заряда, либо же остаток Glu161 заменили Gly, потому что это допускает широкий диапазон диэдральных углов.

Для области $\alpha 2$ - виток - $\alpha 2$ (остатки 153-168) в базе данных Brookhaven искали структурно гомологичную спираль-виток-спираль из стабильного белка, который не рефолдирует, с тем, чтобы найти остаток, который мог бы заменить неблагоприятный Glu161. В витке из нескольких белков спираль-виток-спираль обнаружили высокую структурную гомологию, все белки в гомологичной 161 позиции имели пролин (PDB-коды 2hgs, 3kal, 2o2z, 2zk3 и 2zqp). Согласно выверке, показанной ниже, замена Glu161 на Pro является хорошим структурным решением для стабилизации этого витка и предотвращения его повторной укладки.

AVSKVLHLEGEVNKIK RSV-F HRA 153-168

KVQQELSRP~~GM~~LEMLL 2hgs

KIQQELAKP~~GV~~LRFV 3kal

SVLPNLLV~~P~~GICEAIK 2o2z

avSKVLH-LEGEVNKIK RSV-F HRA 153-168

ikTPLVDdL~~P~~GAE~~E~~AMS 1zk3

AVSKVLH-LEGEVNKIK 2zqp

В некоторых вариантах осуществления остаток Ser173 заменили Pro для стабилизации витка и предотвращения его повторной укладки. В некоторых вариантах осуществления остаток Thr174 заменили Pro для стабилизации витка и предотвращения его повторной укладки.

Карта Рамачандрана показывает, что аминокислотный остаток 182 в витке между $\beta 3$ и $\beta 4$ тоже имеет плохие/неблагоприятные диэдральные углы. Оптимизация этой позиции может повысить стабильность витка и стабилизировать р-шпильку.

Для области $\beta 3$ - виток - $\beta 4$ (остатки 177-189), в базе данных Brookhaven искали структурно гомологичную β -шпильку из стабильного белка, который не рефолдирует, чтобы найти остаток, который мог бы заменить неблагоприятный Ser182. Из-за предполагаемого переноса электронов белка, который имел пролин в гомологичном положении 182, в витке внутри β -шпильки обнаружили высокую структурную гомологию (PDB-код 3me8). Согласно выверке, показанной ниже, замена Ser182 на Pro является хорошим структурным решением для стабилизации этого витка и предотвращения его повторной укладки.

AVVSL~~S~~NgV-SVLT

VVVLs~~PE~~lQiKDYI

Образование цистинового мостика в нижней части области головки между остатками 486, 487, 489.

Отрицательно заряженные аминокислотные остатки 486, 487 и 489 являются частью механизма переключения, который контролирует переход между структурами RSV-F перед слиянием и после слияния. Мутация Glu487 в Gln ослабит этот переключатель и стабилизирующий контакт между протомерами в тримере. Эти же положения остатков могут использоваться также для конструирования дисульфидных мостиков между протомерами. Мутации 2 остатков по цистеину, как описано выше, снизят отталкивание отрицательного заряда и обеспечат дисульфидные мостики, которые в дальнейшем стабилизируют тример перед слиянием.

Осуществляли варианты, которые содержали точечные мутации, стабилизирующие витки между вторичными структурными элементами в области HRA белка RSV-F перед слиянием, чтобы увеличить стабильность и уровни экспрессии конформации перед слиянием. Результаты показаны в табл. 14.

Таблица 14. Экспрессия и стабильность вариантов A2 F24- (SEQ ID NO: 19)

обозначение белка	экспрессия	Стабильность	
	по отношению к A2 F24-	день 5-7	день 30
A2 F24- E161P	2,739	75,08	66,24
A2 F24- E161Q	0,410	133,71	N.A.
A2 F24- E161G	0,391	106,42	N.A.
A2 F24- S173P	1,182	85,78	N.A.
A2 F24- I214P	0,288	80,20	N.A.
A2 F24- T174P	0,448	39,82	N.A.
A2 F24- S182P	2,296	87,19	N.A.
A2 F24- N67I S215P E161P	35,766	97,67	100,56
A2 F24- N67I S215P E161Q	9,545	104,40	96,60
A2 F24- N67I S215P E161G	12,035	93,70	81,91
A2 F24- N67I S215P S173P	21,747	103,43	71,89
A2 F24- N67I S215P I214P	8,053	99,47	68,17
A2 F24- N67I S215P T174P	5,431	N.A.	N.A.
A2 F24- N67I S215P S182P	14,948	N.A.	N.A.

Все варианты являются вариантами A2_F24 типа A2, которые содержат фибритиновый мотив и линкер GSGSG между F1 и F2; точку терминации 513, (SEQ ID NO: 19).

Устойчивость выражается как концентрация белка в %, измеренная по Qoctet (Пример 10) после хранения при 4°C в течение 5-30 дней, относительно дня сбора клеток. Концентрации измеряли количественной методикой Octet использованием антитела CR9502. NA: данные отсутствуют: не обнаружили никакой связи CR9502-связи.

ND: Не определено.

Из-за отдельных точечных мутаций замена положений 173, 182 и 161, особенно в пролине, привела к повышению уровней экспрессии и стабильности. Снятие заряда остатка 161 стабилизировало белки, но не увеличило уровень экспрессии. Те же точечные мутации давали подобный эффект в стабилизированной F-последовательности перед слиянием, которая содержала дополнительную стабилизирующую мутацию N67I и S215P. Мутация остатка 182, 173 и 161, особенно в пролине, выявила наибольшее увеличение уровней устойчивости и экспрессии.

Мутации E161P, которые проявили высокий уровень экспрессии и хорошую стабильность конформации перед слиянием, применили также к растворимым вариантам A2 F-эктодомена RSV без мутаций в сайте расщепления фурина (F18: SEQ ID NO 71) для оценки, являются ли модификации универсальным решением для стабилизации F RSV перед слиянием (таблица 15).

Таблица 15. Экспрессия и стабильность вариантов A2_F18 (SEQ ID No: 71) с дополнительными мутациями

белок RSV	SEQ ID	Относительная экспрессия*	стабильность** после 15 дней (%)
A2_F18	71	0,1	0,0
A2_F18 N67I		19,6	29
A2_F18 S215P		8,4	4
A2_F18 E487Q		0,0	ND
A2_F18 E161P		4,2	0
A2_F18 N67I, S215P	72	32,1	95
A2_F18 N67I, E161P		34,2	72
A2_F18 N67I, S215P, E161P		56,1	79
A2_F18 N67I, S215P, E161P, E487Q		55,5	91
A2_F18 N67I, S215P, E487Q	76	21,8	95

Экспрессию белка (концентрация в супернатанте временно трансфицированных клеток) определяли с помощью количественной методики Octet.

* Относительная экспрессия нормализована по отношению к экспрессии A2_F24_N67I, S215P, E487Q (seq ID #33).

** Стабильность выражается как концентрация белка в %, измеренная по Octet (Пример 10) после хранения при 4°C в течение 5 дней, по отношению к дню сбора клеток. Концентрации измеряли количественным методом Octet с использованием антитела CR9501. ND: Не определено.

Мутация E161P также выявила высокий рост уровней экспрессии в обработанном белке RSV-F. В сочетании со стабилизирующими точечными мутациями, например, в положении 67, 215 и 487, мутация E161P привела к вариантам F перед слиянием с высоким уровнем экспрессии и высокой стабильностью.

Образование цистинового мостика в нижней части области головки между остатками 486, 487, 489.

Отрицательно заряженные аминокислотные остатки 486, 487 и 489 являются частью механизма переключения, который контролирует переход между структурами RSV-F перед слиянием и после слияния. Мутация Glu487 в Gln ослабит переключатель и стабилизирует контакт между протомерами в тримере (предыдущий патент P00). Эти же положения остатков могут быть также использованы для конструирования дисульфидных мостиков между протомерами. Мутации 2 остатков цистеина, из которых один является отрицательно заряженным остатком 486, 486 или 489, снизит отталкивание негативного заряда и обеспечит дисульфидные мостики, которые в дальнейшем стабилизируют тример перед слиянием. Некоторые из таких вариантов исследовали на уровень экспрессии и стабильность конформации перед слиянием (табл. 16).

Таблица 16. Экспрессия и стабильность вариантов A2_F24- (SEQ ID NO: 19)

обозначение белка	Экспрессия	Стабильность
	по отношению к A2_F24-	день 30
A2_F24 D489C L481C	0	
A2_F24 D489C V482C	0	N.D.
A2_F24 D489C D479C	0	N.D.
A2_F24 D489C T374C	0	N.D.
A2_F24 D489C L375C	0	N.D.
A2_F24 D489C P376C	0	N.D.
A2_F24 D489C S377C	0	N.D.
A2_F24 D489C T335C	0	N.D.
A2_F24 D489C D338C	0	N.D.
A2_F24 D489C S398C	0	N.D.
A2_F24 D486C E487C	0,524	N.D.
A2_F24 D489C D486C	0,062	N.D.
A2_F24 N67I S215P D489C D486C	3,875	76,02
A2_F24 N67I S215P D489C S398C	0,003	N.D.
A2_F24 N67I S215P D486C E487C	7,315	79,39

Все варианты являются вариантами A2_F24- типа A2, которые содержат фибритиновый мотив и линкер GSGSG между F1 и F2; точку терминации 513, (SEQ ID NO: 19).

Стабильность выражается как концентрация белка в % по Qoctet (пример 10), измеренная после хранения при 4°C в течение 5-30 дней, относительно дня сбора клеток. Концентрации измеряли количественным методом Octet с использованием антитела CR9502. На метастабильном фоне F24 (SEQ ID NO: 19), только дисульфидный мостик между остатками 486 и 487 дал в результате белок перед слиянием с приемлемой экспрессией и стабильностью. Поскольку в меж-протомерных дисульфидах нужно правильно выравнивать противоположные боковые цепи, связность дисульфида может быть успешнее в более стабильном F-белке, по сравнению с метастабильным вариантом F24. Таким образом, некоторые из дисульфидов также разработаны в варианте F24, который содержал 2 стабилизирующие мутации N67I и S215P. В самом деле, на стабильном фоне белки со встроенными дисульфидами экспрессировали на гораздо более высоких уровнях. Опять же, вариант с цистеиновыми мутациями в положении 486 и 487 экспрессировался на самом высоком уровне и уровень экспрессии был в 14 раз выше, по сравнению с нестабилизированным вариантом без мутации N67I и S215P. Стабильность протеина в надосадочной жидкости приемлема и все еще содержала 79% конформации перед слиянием. Высокая стабильность может быть достигнута, когда белок очищенный. Стабильность может и не достигать 100%, потому что меж-протомерными связями были соединены не 100% цистеинов, как показано на примерах 4 и 5.

Пример 4. Вестерн-блоттинг.

Культуральные супернатанты прогоняли в 4-12% (вес/объем) градиентных гелях Bis-Tris NuPAGE (Life Technology) и проводили блоттинг с помощью технологии iBlot (Life Technology). Эти блоты зондировали с помощью CR9503 (последовательности приведены ниже в табл. 18) и выявляли либо с конъюгированным мышинным антителом против человеческого IgG (Jackson ImmunoResearch, Вест Гров, Пенсильвания), либо подобием очищенного конъюгированного IRDye800CW против человеческого IgG (кролик) (Rockland Immunochemicals, Гилберствилл, Пенсильвания). На фиг. 1 можно увидеть выражение DM = двойной мутант (N67I + S215P = SEQID 21) и DM + CC = двойной мутант + DE486CC = SEQID 94). Четкое различие между этими двумя белками могли наблюдать, когда анализировали их редуцированными и нередуцированными. При редукации, оба белка мигрируют как мономерные разновидности около 55 кДа. Нередуцированное подавляющее большинство DM по-прежнему находится в виде мономера, в то время как разновидности DM + CC преобладают гораздо больше, причем они преимущественно тримерные. Это доказывает, что замена остатка 486 и 487 в цистеине приводит к тримеру с преимущественно меж-протомерными дисульфидными мостиками.

Пример 5. NativePAGE.

Для исходного определения мультимерного состояния F-полипептидов перед слиянием в соответствии с настоящим изобретением супернатанты культур от временно трансфицированных клеток анализировали в гель-системе NativePAGE Bis-Tris (Life Technologies). Затем гели подвергали блоттингу с использованием iBlot technolog в соответствии с инструкциями производителя (Life Technologies). Специфическое F-белковое RSV-антитело CR9503 (последовательности, приведенные ниже в табл. 18) использовали в качестве первичного зонда для обнаружения F-белка RSV перед слиянием и последующим HRP конъюгированным мышинным антителом против человеческого IgG (Jackson ImmunoResearch, Вест Гров, Пенсильвания) или подобием очищенного конъюгированного IRDye800CW против человеческого IgG (кролик) (Rockland Immunochemicals, Гилберствилл, Пенсильвания). Блоты проявляли с использованием стандартной пленки (Codalak) или с использованием инфракрасной системы для визуализации Odyssey CLx. На фиг. 2 изображен анализ супернатанта посредством нативного электрофореза в полиакриламидном геле (NativePAGE analysis) из Линии 2: DM = двойной мутант (N67I + S215P = SEQID 21) и Линия 1: DM+CC = двойной мутант + DE486CC = SEQID 5A). И DM, и DM+CC являются, прежде всего, тримерными при нативном электрофорезе, показывая, что введение дисульфидов не может привести к меж-тримерному перекрестному сшиванию. Поскольку DM+CC экспрессируется хуже, чем DM, недосажающий мономер (шпилька) может быть из-за того, что он ниже предела обнаружения.

Пример 6. Экспрессия F-белка перед слиянием.

Плазмиды экспрессии, кодирующие рекомбинантный F-белок RSV перед слиянием, создавали с помощью стандартных способов, широко известных в данной области, включая сайт-направленный мутагенез и ПЦР. Используемой системой для экспрессии были клетки 293Freestyle (Life Technologies, Ренфрушир, Великобритания). Клетки временно трансфицировали с помощью 293Fectin (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя и культивировали во встряхивателе-инкубаторе в течение 5 дней при 37°C и 10% CO₂. Супернатант культуры собирали и центрифугировали в течение 5 минут при 300 g для удаления клеток и клеточного дебриса. Отцентрифугированный супернатант затем фильтровали в стерильных условиях с помощью 0,22 мкм вакуумного фильтра и хранили при 4°C до использования.

Пример 7. Очистка F-белка RSV перед слиянием.

Рекомбинантные полипептиды очищали с помощью 2-стадийного протокола очистки с применением катион-обменной колонки для первичной очистки, а затем колонки superdex200 для завершающей стадии с удалением остаточных примесей. Для исходной ионообменной стадии супернатант культуры

разбавляли 2 объемами по 50 mM NaOAc, pH 5,0, и пропускали через 5 мл колонку HiTrap Capto S при скорости 5 мл в минуту. Затем колонки отмывали 10 объемами, соответствующими объему колонки (CV), по 20 mM NaOAc, 50 mM NaCl, 0,01% (об./об.) tween20, pH 5 и элюировали 2 CV по 20 mM NaOAc, 1M NaCl, 0,01% (об./об.) tween20, pH 5. Элюат концентрировали с помощью концентратора-центрифуги, а затем белок очищали с помощью колонки superdex200 с использованием 40 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,01% (об./об.) tween20, pH 7,4, в качестве подвижного буфера. На фиг. 3А представлена хроматограмма с гель-фильтрационной колонки и главный пик содержит F-белок RSV перед слиянием. Фракции, содержащие этот пик, снова объединяли и концентрацию белка определяли при OD280 и хранили при 4°C до использования. На фиг. 3В представлен сокращенный результат анализа SDS-PAGE конечного препарата белка, и можно видеть, что чистота составляла >95%. Идентичность полосы подтверждали с помощью вестерн-блоттинга и специфических к F-белку антител (не показано). Далее, очищенный белок тестировали на нативном электрофорезе (NativePAGE) и сравнивали с контрольным стабильным тримером F-белка перед слиянием (SEQ ID NO: 21) (фиг. 3С).

Пример 8. Анализ конечной стабильности.

Проверку конформации перед слиянием экспрессируемых полипептидов по настоящему изобретению делали с использованием технологии Octet, с использованием специфических антител CR9501 или CR9502 перед слиянием, или же неструктурированного специфического антитела CR9503, которое содержит изменчивые области с тяжелыми и легкими цепями коммерчески доступного антитела мотавизумаб. Антитела биотинилировали в соответствии со стандартными протоколами и иммобилизовали на стрептавидиновом биосенсоре (ForteBio, Портсмут, Великобритания). Процедура заключалась в следующем. После уравнивания сенсоров в кинетическом буфере (ForteBio) в течение 60 с чипы переносили в PBS (натрий-фосфатный буфер) с 5 мкг/мл требуемого антитела. Загрузку проводили в течение 250 с. Затем включали другую стадию уравнивания в течение 200 с в кинетическом буфере. В заключение, чипы переносили в экспрессивный супернатант культуры, содержащий F-полипептиды RSV перед слиянием и через 1200 сек записывали общий сигнал связывания. Эта фаза также обозначается как фазовая ассоциация. Это выполняли непосредственно после сбора клеток (1 день), а также спустя 5 дней (5 день), и разницу в связывании CR9501 использовали в качестве скринингового средства для выявления мутаций, способных стабилизировать конформацию перед слиянием. Конструкцию считали стабильной, если наблюдали менее 20% потери связывания на 5 день, также ее считали стабильной, если она не была признана неустойчивой. Стабильные конструкции затем подвергали более строгому исследованию при необходимости. Анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения ForteBio Data Analysis 6.4 (ForteBio).

Пример 9. Анализ термостабильности.

Стабилизирующий потенциал введенных характеристик в F-полипептиды RSV определяли по тепловому стрессу. Для этой цели супернатант культур от временно трансфицированных клеток или очищенный белок нагревали с использованием диапазона температур. Образцы затем охлаждали на льду для предотвращения дополнительных индуцированных теплом конформационных изменений и инкубировали с антителом CR9501 в системе по технологии Octet, как описано в примере 11. Ответы, полученные в конце фазовой ассоциации при различных температурах, изображали на графике в виде функции температуры и приближали с помощью нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения Prism. Это приводило к определению температуры, где уровень связывания антител составляет 50% от максимума, и эту величину можно было использовать для сравнения различных конструкций в отношении термостабильности перед слиянием.

Пример 10. Анализ стабильности фазовой ассоциации.

Для оценки стабильности различных точечных мутаций Octet анализ связывания разработали с использованием ассоциативного фазового анализа. Антитело CR9501 или антитело CR9502 использовали в качестве зондов для конформации белка RSV-F перед слиянием. Чтобы уменьшить потенциальное смещение концентрации анализа конечных точек, точки данных были использованы из всей фазы ассоциации эксперимента. Данные восполняли за счет количества связанного антитела на чипе. Измерения выполняли в 1, 5 и 33 дни, и сравнивали формы кривых по этим трем дням. Если получали идентичные кривые, то конструкцию считали стабильной, а если нет, то нестабильной.

Пример 11. Количественный анализ с использованием Octet.

Для определения концентрации F-белка RSV в супернатантах клеточных культур использовали количественный метод на основе Octet. Антитела CR9501 и CR9503 биотинилировали с помощью стандартных протоколов и иммобилизовали на стрептавидиновых биосенсорах (ForteBio, Портсмут, Великобритания). После этого покрытые биосенсоры блокировали в супернатанте ложно-трансфицированных клеточных культур. Количественный эксперимент выполняли следующим образом: температура 30°C, скорость встряхивания 1000 об./мин, время анализа 300 с. Концентрацию белка в супернатанте клеточной культуры рассчитывали с помощью стандартной кривой. Стандартную кривую получали для каждого покрытого антитела с использованием белка A2_F24_N67I+S215P (SEQ ID# 21), разбавленного в супернатанте ложно-трансфицированных клеточных культур. Измерения проводили в день сбора супернатанта (1 день) и после хранения супернатанта при 4°C в течение 5 дней или дольше. Разницу в концен-

трации, определенную с помощью CR9501 или CR9502, использовали в качестве скринингового инструмента для выявления мутаций, способных стабилизировать конформацию перед слиянием.

Конструкция считалась стабильной, если наблюдалось менее, чем 20% снижения определяемой концентрации на 5 день. Анализ данных выполняли с помощью компьютерной программы ForteBio Data Analysis 6.4 (ForteBio).

Пример 12. Доклиническая оценка иммуногенности F перед слиянием.

Для определения иммуногенности стабилизированного F RSV перед слиянием (A2F24,N67I, S215P) (SEQ ID NO: 21) мышей иммунизировали в соответствии с табл. 19 с 0,5 или 5 мкг в прайм-бустерном режиме на 0 неделе и на 4 неделе. Как представлено на фиг. 4, мыши, иммунизированные F перед слиянием, демонстрировали более высокие титры VNA, чем мыши, иммунизированные F после слияния RSV.

Таблица 19. Схема иммунизации

Группа	Препарат	Доза	Адъювант	N
1	F после слияния	0,5 мкг	–	9
2	F после слияния	5 мкг	–	9
3	F перед слиянием	0,5 мкг	–	9
4	F перед слиянием	5 мкг	–	9
5	F после слияния	0,5 мкг	Поли (I:C)	9
6	F перед слиянием	0,5 мкг	Поли (I:C)	9
8	FI-RSV	1/75	–	8
9	PBS		–	3

Затем хлопковых крыс иммунизировали двумя различными дозами RSV-F в конформации после слияния и перед слиянием (табл. 20). Животных иммунизировали i.m. на 0 неделе и 4 неделе. На фиг. 5 представлены высокие титры нейтрализующих антител в день контрольного заражения (7 неделя).

Таблица 20. Группы, иммуноген и доза для определения иммуногенности и эффективности у хлопковых крыс

Группа	Препарат	Доза	Адъювант
1	F после слияния	0,5 мкг	–
2	F после слияния	5 мкг	–
3	F перед слиянием	0,5 мкг	–
4	F перед слиянием	5 мкг	–
9	F перед слиянием	0,5 мкг	Поли IC
10	F перед слиянием	5 мкг	Поли IC
11	F перед слиянием	0,5 мкг	Фосфатный адъювант
12	F перед слиянием	5 мкг	Фосфатный адъювант
13	Ad26.RSV.FA2	10 ⁸	–
14	PBS	–	–

Вирусную нагрузку в легких и носу определяли через пять дней после контрольного заражения (см. фиг. 6). Показано, что F-полипептиды перед слиянием в соответствии с настоящим изобретением способны индуцировать мощный иммунный ответ, который снижал вирусную нагрузку в легких и даже в носу.

Таблица 17. Стандартные аминокислоты, аббревиатуры и свойства

Аминокислота	3- буквенная	1- буквенная	Полярность боковой цепи	Заряд боковой цепи (pH 7,4)
<u>аланин</u>	Ala	A	неполярная	Нейтральный
<u>аргинин</u>	Arg	R	полярная	Положительный
<u>аспарагин</u>	Asn	N	полярная	Нейтральный
<u>аспарагиновая кислота</u>	Asp	D	полярная	Отрицательный
<u>цистеин</u>	Cys	C	неполярная	Нейтральный
<u>глутаминовая кислота</u>	Glu	E	полярная	Отрицательный
<u>глутамин</u>	Gln	Q	полярная	Нейтральный
<u>глицин</u>	Gly	G	неполярная	Нейтральный
<u>гистидин</u>	His	H	полярная	положительный (10%) нейтральный (90%)
<u>изолейцин</u>	Ile	I	неполярная	Нейтральный
<u>лейцин</u>	Leu	L	неполярная	Нейтральный
<u>лизин</u>	Lys	K	полярная	Положительный
<u>метионин</u>	Met	M	неполярная	Нейтральный
<u>фенилаланин</u>	Phe	F	неполярная	Нейтральный
<u>пролин</u>	Pro	P	неполярная	Нейтральный
<u>серин</u>	Ser	S	полярная	Нейтральный
<u>треонин</u>	Thr	T	полярная	Нейтральный
<u>триптофан</u>	Trp	W	неполярная	Нейтральный
<u>тирозин</u>	Tyr	Y	полярная	Нейтральный
<u>валин</u>	Val	V	неполярная	Нейтральный

Таблица 18. Аминокислотные последовательности антител CR9501 и CR9502

Антитело	Домен VH	CDR1 VH	CDR2 VH	CDR3 VH
CR9501	Аминокислоты 1-125 в SEQ ID NO: 53	GASINSDNYWT (SEQ ID NO:54)	HISYTGNTY YTPSLKS (SEQ ID NO:55)	CGAYVLISN CGWFDS (SEQ ID NO:56)
CR9502	Аминокислоты 1-121 в SEQ ID NO: 57	GFTFSGHTIA (SEQ ID NO:58)	WVSTNNGNT EYAQKIQG (SEQ ID NO:59)	EWLVMGGF AFDH (SEQ ID NO:60)
Антитело	Домен VL	CDR1 VL	CDR2 VL	CDR3 VL
CR9501	Аминокислоты 1-107 в SEQ ID NO: 61	QASQDISTYLN (SEQ ID NO: 62)	GASNLET (SEQ ID NO:63)	QQYQYLPYT (SEQ ID NO:64)
CR9502	Аминокислоты 1-110 в SEQ ID NO: 65	GANNIGSQNVH (SEQ ID NO:66)	DDRDRPS (SEQ ID NO:67)	QVWDSSRD QAVI (SEQ ID NO:68)

Аминокислотная последовательность нескольких конструкций F RSV перед слиянием приведена ниже. Следует отметить, что нумерация аминокислот в различных конструкциях, описанных в данном

документе, основана на последовательности дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая означает, что все аминокислоты с 1 положения до 108 положения, включительно, конструкций перед слиянием соответствуют положениям аминокислот 1-108 последовательности дикого типа, где нумерация аминокислот с 138 положения до конца смещена на 22 аминокислоты, т.е. L138 в последовательности дикого типа (SEQ ID NO: 1) соответствует L116 во всех конструкциях перед слиянием. Это связано с тем фактом, что была выполнена делеция в конструкциях перед слиянием, т.е. вставка линкера GSGSG, при этом фактическая нумерация F1 не является одинаковой между конструкциями. Таким образом, нумерация, используемая по отношению к специфическим мутациям в соответствии с настоящим изобретением, например, S215P, относится к положению аминокислоты в последовательности дикого типа.

Последовательности

Полноразмерная последовательность F-белка RSV A2 (SEQ ID NO: 1)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
ELSNIKKNKNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAK
KTNVTLSKKRRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSV
LTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTPVSTYM
LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDGRWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGNGCDYVS
NKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIR
KSEDELLHNVNAVKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIA
FSN

Полноразмерная последовательность F-белка RSV B1 (SEQ ID NO: 2)

MELLIHRLSAIFLTALAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITI
ELSNIKETKNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRAREAPQYMNNTINTTK
NLNVSISKRRRFLGFLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLNGVSV
LTSKVLDLKNYINNQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNSRLLEINREFSVNAGVTTPVSTYM
LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDGRWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
SLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGNGCDYVS
NKGVDTVSVGNTLYYVNVKLEGKNLYVKGEPIINYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIR
RSEDELLHNVNTGKSTTNIMITTIIIVIIIVLLSLIAIGLLLYCKAKNTPVTLSKDQLSGINNIA
FSK

SEQ ID NO: 3

EKKIEAIEKKIEAIEKKIEA

SEQ ID NO: 4

GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL

SEQ ID NO: 5

GSGSG

F8: RSV A2, эктодомен дикого типа (SEQ ID NO: 13)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI

ELSNIKKNKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
 KTNVTLSKKRRRFLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSV
 LTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTTPVSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDGRWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSV
 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIR
 KSDELLHHHHHHHHH

F11: RSV B1, эктодомен дикого типа (SEQ ID NO: 14)

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARREAPQYMNNTINTTK
 NLNVSISKRRRFLGFLGVSAGVAVSKVLHLEGEVNIKNALLSTNKAVVSLNNGVSV
 LTSKVLDLKNYINNQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNSRLEINREFSVNAGVTTPLSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDGRWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSV
 SLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVNVKLEGKNLYVKGEPIINYYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIR
 RSDELLHHHHHHHHH

F47: RSV A2, стабилизированный линкером, IZ(S) (SEQ ID NO: 15)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKKNKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVS
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
 QSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSVNLNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGK
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVEKKIEAIEKKIEAIEKKIEAGGIEGRHHHHHHHHH

F47-: RSV A2, стабилизированный линкером, IZ(S) (SEQ ID NO: 16)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKKNKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVS
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
 QSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSVNLNVDIFNPKYDCKIMTSKTD

VSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVНКQEGK
SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVEKKIEAIEKKIEAIEKKIEAGG

F43: RSV B1, стабилизированный линкером, IZ(S) (SEQ ID NO: 17)

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITI
ELSNIKETKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLGFLGVG
SAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYINNQLLPVNVQ
QSCRISNIETVIEFQQKNSRLLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
MSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRT
DRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTD
ISSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVНКLEGK
NLYVKGEPIINYYDPLVFPSEFDASISQVEKKIEAIEKKIEAIEKKIEAGGIEGRHHHHHH

F24: RSV B1, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 18)

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITI
ELSNIKETKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLGFLGVG
SAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYINNQLLPVNVQ
QSCRISNIETVIEFQQKNSRLLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
MSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRT
DRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTD
ISSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVНКLEGK
NLYVKGEPIINYYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGRHHHHHH

A2_F24: RSV A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 19)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
ELSNIKKNKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVG
SAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
QSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
VSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVНКQEGK
SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

F24-: RSV B1, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 20)

MELLIHRLSAIFLTALINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKETKCN~~GT~~DTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLGFLLGVG
 SAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLSNGVSVLT~~SKV~~DLK~~NY~~INNQLLP~~IV~~NQ
 QSCRISNIETVIEFQQKNSRLLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSSNVQIVRQQSYSIMSI~~I~~KEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICL~~TR~~T
 DRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTD
 ISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI~~I~~KTF~~S~~NGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV~~N~~KLEGK
 NLYVKGEPIINYYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDG~~EW~~VLLSTFLGGIEGR

**A2_F24 N67I+S215P: A2, стабилизированный линкером, фибритин
 (SEQ ID NO: 21)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCN~~GT~~DAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLT~~SKV~~DLK~~NY~~IDKQLLP~~IV~~NK
 QSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTVPSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSI~~I~~KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICL~~TR~~T
 DRGWYCDNAGSVSFFPQ~~A~~ETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI~~I~~KTF~~S~~NGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV~~N~~KQEGK
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRK~~S~~DELLSAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDG~~EW~~VLLSTFLGGIEGR

**F24-N67I+S215P: RSV B1, стабилизированный линкером,
 фибритин (SEQ ID NO: 22)**

MELLIHRLSAIFLTALINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKEIKCN~~GT~~DTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLGFLLGVG
 SAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLSNGVSVLT~~SKV~~DLK~~NY~~INNQLLP~~IV~~NQ
 QSCRIPNIETVIEFQQKNSRLLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSSNVQIVRQQSYSIMSI~~I~~KEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICL~~TR~~T
 DRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTD
 ISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI~~I~~KTF~~S~~NGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV~~N~~KLEGK
 NLYVKGEPIINYYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDG~~EW~~VLLSTFLGGIEGR

**A2_F24 N67I+E92D: RSV A2, стабилизированный линкером,
 фибритин (SEQ ID NO: 23)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCN~~GT~~DAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLT~~SKV~~DLK~~NY~~IDKQLLP~~IV~~NK

QSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGK
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGWVLLSTFLGGIEGR

**F24- N67I+E92D RSV B1, стабилизированный линкером, фибритин
 (SEQ ID NO: 24)**

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKEIKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLGFLGVG
 SAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKIKNALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYINNQLLPVNO
 QSCRISNIETVIEFQQKNSRLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSSNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTD
 ISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKLEGK
 NLYVKGEPIINYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLESAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGWVLLSTFLGGIEGR

**A2_F24 N67I+K465Q RSV A2, стабилизированный линкером,
 фибритин (SEQ ID NO: 25)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNO
 QSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGQ
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGWVLLSTFLGGIEGR

**F24- N67I+K465Q RSV B1, стабилизированный линкером,
 фибритин (SEQ ID NO: 26)**

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKEIKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLGFLGVG
 SAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKIKNALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYINNQLLPVNO
 QSCRIPNIETVIEFQQKNSRLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSSNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTD

ISSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKLEGQ
 NLYVKGEPI INYYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

A2_F24 N67I+S46G RSV A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 27)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
 QSCSISNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGK
 SLYVKGEPI INFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

F24- N67I+S46G RSV B1, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 28)

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFGALRTGWYTSVITI
 ELSNIKEIKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLGFLGVG
 SAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYINNQLLPVNVQ
 QSCRISNIETVIEFQQKNSRLLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTD
 ISSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKLEGK
 NLYVKGEPI INYYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

A2_F24 E92D+S215P: A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 29)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKNCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
 QSCSIPNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGK
 SLYVKGEPI INFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

F24-E92D+S215P: RSV B1, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 30)

MELLIHRLSAIFLTALINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITI
ELSNIKETKCNNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLGFLGVLG
SAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKNALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYINNQLLPVNVQ
QSCRIPNIETVIEFQQKNSRLLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPIITNDQKKL
MSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRT
DRGWYCDNAGSVSFFPQADTKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTD
ISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGK
NLYVKGEPIINYYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
YVRKDGWVLLSTFLGGIEGR

A2_F24 N67I+S215P+K508E: A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 31)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
ELSNIKKIKCNNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVLG
SAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
QSCSIPNIETVIEFQQKNRRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPIITNDQKKL
MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGK
SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRESDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
YVRKDGWVLLSTFLGGIEGR

A2_F24 N67I+S215P+E487I: A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 32)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
ELSNIKKIKCNNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVLG
SAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
QSCSIPNIETVIEFQQKNRRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPIITNDQKKL
MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGK
SLYVKGEPIINFYDPLVFPSDIFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
YVRKDGWVLLSTFLGGIEGR

A2_F24 N67I+S215P+E487Q: A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 33)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI

ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
 QSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGK
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSDQFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

**A2_F24 N67I+S215P+E487N: A2, стабилизированный линкером,
 фибритин (SEQ ID NO: 34)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
 QSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGK
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSDNFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

**A2_F24 N67I+S215P+D486N: A2, стабилизированный линкером,
 фибритин (SEQ ID NO: 35)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
 QSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGK
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

**A2_F24 N67I+S215P+K465E: A2, стабилизированный линкером,
 фибритин (SEQ ID NO: 36)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
 QSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL

MSNNVQIVRQQSYSIMSI I KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI I KTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGE
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

**A2_F24 N67I+S215P+K465Q: A2, стабилизированный линкером,
 фибритин (SEQ ID NO: 37)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSTKVLDLKNYIDKQLLPVKN
 QSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSI I KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI I KTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGQ
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

**A2_F24 N67I+S215P+N426S: A2, стабилизированный линкером,
 фибритин (SEQ ID NO: 38)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSTKVLDLKNYIDKQLLPVKN
 QSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSI I KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASSKNRGI I KTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGK
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

**A2_F24 N67I+S215P+K421N: A2, стабилизированный линкером,
 фибритин (SEQ ID NO: 39)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSTKVLDLKNYIDKQLLPVKN
 QSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSI I KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGKTNCTASNKNRGI I KTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGK

SLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSEDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

**A2_F24 N67I+S215P+K209Q: A2, стабилизированный линкером,
фибрин (SEQ ID NO: 40)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVG
SAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVQ
QSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
VSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVNVKQEGK
SLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSEDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

**A2_F24 N67I+S215P+K201Q: A2, стабилизированный линкером,
фибрин (SEQ ID NO: 41)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVG
SAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDQQLLPVNVK
QSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
VSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVNVKQEGK
SLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSEDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

**A2_F24 N67I+S215P+V185N: A2, стабилизированный линкером,
фибрин (SEQ ID NO: 42)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVG
SAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGNSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
QSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
VSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVNVKQEGK
SLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSEDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

A2_F24 N67I+S215P+G184N: A2, стабилизированный линкером,

фибрин (SEQ ID NO: 43)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLG
 VSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP
 IVNKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMP
 ITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNT
 KEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDI
 FNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVSNGV
 DTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRK
 SDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGGIEGR

**A2_F24 N67I+S215P+N175P: A2, стабилизированный линкером,
 фибрин (SEQ ID NO: 44)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLG
 VSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTPKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP
 IVNKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMP
 ITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNT
 KEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDI
 FNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVSNGV
 DTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRK
 SDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGGIEGR

**A2_F24 N67I+S215P+E92D: A2, стабилизированный линкером,
 фибрин (SEQ ID NO: 45)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLG
 VSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP
 IVNKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMP
 ITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNT
 KEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDI
 FNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVSNGV
 DTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRK
 SDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGGIEGR

**A2_F24 N67I+S215P+K80E: A2, стабилизированный линкером,
 фибрин (SEQ ID NO: 46)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIEQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLG
 V

SAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNQVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
 QSCSIPNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNQCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVNVKQEGK
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSEDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

A2_F24 N67I+S215P+K77E: A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 47)

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIELIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNQVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
 QSCSIPNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNQCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVNVKQEGK
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSEDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

A2_F24 N67I+S215P+S46G: A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 48)

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNQVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
 QSCSIPNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNQCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVNVKQEGK
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSEDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

A2_F24: RSV S46G A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 49)

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKNCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNQVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
 QSCSISNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT

DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGK
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

**A2_F24: RSV K465Q A2, стабилизированный линкером, фибритин
 (SEQ ID NO: 50)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKNCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
 QSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGQ
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

**A2_F24: RSV N67I A2, стабилизированный линкером, фибритин
 (SEQ ID NO: 51)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKNCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
 QSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGK
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

**A2_F24: RSV E92D A2, стабилизированный линкером, фибритин
 (SEQ ID NO: 52)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKNCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
 QSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGK
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQA

YVRKDGEWVLLSTFLGGIEGR

Полноразмерная последовательность белка F RSV CL57-v224
(SEQ ID NO: 69)

MELPILKTNAITTTILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI
 KENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPAANNRARELPRFMNYTLNNTKNNNV
 LSKKRKRRLGFLGVSAGIAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSTKV
 LDLKNYIDKQLLPVINKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSE
 LLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP
 LCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLTPSEVNLCNI
 DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVD
 TVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSD
 ELHNVNVGKSTTNIMITTTIIIVIIIVILLLLIAVGLFLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

Эктодомен, RSV CL57-v224 (SEQ ID NO: 70)
 MELPILKTNAITTTILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI
 KENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPAANNRARELPRFMNYTLNNTKNNNV
 LSKKRKRRLGFLGVSAGIAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSTKV
 LDLKNYIDKQLLPVINKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSE
 LLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP
 LCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLTPSEVNLCNI
 DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVD
 TVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSD
 EL

PreF, RSV A2, фибритин (SEQ ID NO: 71)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKNCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAK
 KTNVTLSKKRKRRLGFLGVSAGIAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSNGVSV
 LTSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYM
 LTNSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLTPSEV
 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIR
 KSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL

PreF N67I S215P, RSV A2, фибритин (SEQ ID NO: 72)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAK
 KTNVTLSKKRKRRLGFLGVSAGIAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSNGVSV

LTSKVLDLKNYIDKQLLPVIVNKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI I KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI I KTF SNGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIR
 KSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL

PreF N67I S215P, RSV B1, фибритин (SEQ ID NO: 73)

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKEIKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARRREAPQYMNNTINTTK
 NLNVSISKRRKRRFLGFLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVKNIKNALLSTNKAVVSLSNGVSV
 LTSKVLDLKNYINNQLLPVIVNQQSCRIPNIETVIEFQQKNSRLLLEINREFSVNAGVTTPLSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSI I KEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
 SLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI I KTF SNGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVVKLEGKNLYVKGEPI INYYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIR
 RSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL

RSV N67I S215P, RSV CL57-v224, фибритин (SEQ ID NO: 74)

MELPILKTNAITTILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI
 KEIKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPAANNRARRRELPRFMNYTLNNTKNNNV
 LSKRRKRRFLGFLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVKNIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKV
 LDLKNYIDKQLLPVIVNKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSE
 LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI I KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP
 LCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNI
 DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI I KTF SNGCDYVSNKGVD
 TVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL
 LSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL

PreFL N67I S215P, RSV B1, фибритин, петля (SEQ ID NO: 22)

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKEIKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLGFLLGVG
 SAIASGIAVSKVLHLEGEVKNIKNALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYINNQLLPVIVNQ
 QSCRIPNIETVIEFQQKNSRLLLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSSNVQIVRQQSYSIMSI I KEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTR
 DRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTD
 ISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI I KTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKLEGK
 NLYVKGEPI INYYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
 YVRKDGEWVLLSTFL

PreFL N67I S215P, RSV CL57-v224, фибритин, петля (SEQ ID NO: 75)

MELPILKTNAITTILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
ELSNIKEIKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPAANNQARGSGSGRSLGFLGVG
SAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVK
QSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKL
MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNIDIFNPKYDCKIMTSKTD
VSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGIKTFSNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGK
SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQA
YVRKDGEWVLLSTFL

PreF N67I S215P E487Q, RSV A2, фибритин (SEQ ID NO: 76)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
KTNVTLSKKRKRRFLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSV
LTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYM
LTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGIKTFSNNGCDYVS
NKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDQFDASISQVNEKINQSLAFIR
KSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL

PreF N67I S215P K201N, RSV A2, фибритин (SEQ ID NO: 77)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
KTNVTLSKKRKRRFLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSV
LTSKVLDLKNYIDNQLLPVNVKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYM
LTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGIKTFSNNGCDYVS
NKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIR
KSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL

PreF N67I S215P E92D, RSV A2, фибритин (SEQ ID NO: 78)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
KTNVTLSKKRKRRFLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSV
LTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYM

LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI I KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI I KTF SNGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPI I NFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIR
 KSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFL

PreF N67I S215P D486N, RSV A2, фибритин (SEQ ID NO: 79)

MELLILKANAI TTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
 KTNVTLSKKRKRRLGFL LGVGS AIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSL SNGVSV
 LTSKVLDLKNYIDKQLLP IVNKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTPVSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI I KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI I KTF SNGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPI I NFYDPLVFP SNEFDASISQVNEKINQSLAFIR
 KSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFL

Fwt N67I S215P, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID NO: 80)

MELLILKANAI TTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
 KTNVTLSKKRKRRLGFL LGVGS AIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSL SNGVSV
 LTSKVLDLKNYIDKQLLP IVNKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTPVSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI I KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI I KTF SNGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPI I NFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIR
 KSDELLHNVA VKSTTNIMITTTII I VI I VILLSLI AVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIA
 FSN

Fs1 N67I S215P, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID NO: 81)

MELLILKANAI TTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFL LGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSL SNGVSV LTSKVLDLKNYIDKQLLP IVNK
 QSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSI I KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI I KTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGK

SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSEDELLHNVNAVKSTTNIMITT
 IIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

Fwt N67I S215P E92D, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID NO: 82)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
 KTNVTLSKKRKRRLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGVSV
 LTSKVLDLKNYIDKQLLPIVINKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVINKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIR
 KSEDELLHNVNAVKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIA
 FSN

Fs1 N67I S215P E92D, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID NO: 83)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVINK
 QSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVS NKGVDTVSVGNTLYYVINKQEGK
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSEDELLHNVNAVKSTTNIMITT
 IIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

Fwt N67I S215P E487Q, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID NO: 84)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
 KTNVTLSKKRKRRLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGVSV
 LTSKVLDLKNYIDKQLLPIVINKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTPVSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVINKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPDQFDASISQVNEKINQSLAFIR
 KSEDELLHNVNAVKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIA

FSN

Fs1 N67I S215P E487Q, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID NO: 85)

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVVK
 QSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVVKQEGK
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPDQFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKSTTNIMITT
 IIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

Fwt N67I S215P D486N, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID NO: 86)

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAK
 KTNVTLKKRKRRLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGVSV
 LTSKVLDLKNYIDKQLLPIVVKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYM
 LTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVS
 NKGVDTVSGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPNEFDASISQVNEKINQSLAFIR
 KSDELLHNVNAVKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIA
 FSN

Fs1 N67I S215P D486N, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID NO: 87)

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVVK
 QSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVVKQEGK
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPNEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKSTTNIMITT
 IIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

Fwt N67I S215P S46G, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID

NO: 88)

MELLILKANAI TTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
 KTNVTLSKKRRRFLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSV
 LTSKVLDLKNIYIDKQLLPVNVKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTPVSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIR
 KSDELLHNVNAVKSTTNIMITTII IIVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIA
 FSN

Fs1 N67I S215P S46G, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID NO: 89)

MELLILKANAI TTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVG
 SAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPVNVK
 QSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKL
 MSNNVQIVRQQSYSIMSI IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRT
 DRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTD
 VSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGK
 SLYVKGEPI INFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKSTTNIMITT
 I IIVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

CR9501, тяжелая цепь (SEQ ID NO: 53):

QVQLVQSGPGLVKPSQTLALTCNVSGASINSDNYWTWIRQRPGGGLEWIGHISYTGNT
 YYTPSLKSRLSMSLETSQSQFSLRLTSVTAADSAVYFCAACGAYVLISNCWFDSWGQGTQVTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

CR9501, легкая цепь (SEQ ID NO: 61):

EIVMTQSPSSLSASIGDRVTITCQASQDISTYLNWYQQKPGQAPRLLIYGASNLETGVP
 SRFTGSGYGTDFSVTISSLQPEDIAITYYCQQYQYLPYTFAPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE
 KHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

CR9502, тяжелая цепь (SEQ ID NO: 57):

EVQQLQSGAELKKPGASVKISCKTSGFTFSGHITIAWVRQAPGQGLEWMGWVSTNNGNTE
 YAQKIQGRVTMTMDTSTSTVYMELRSLTSDDTAVYFCAREWLVMGGFAFDHWGQGTLLTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS

SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC

CR9502, легкая цепь (SEQ ID NO: 65):

QSVLTQASSVSVAPGQTARITCGANNIGSQNVHWYQQKPGQAPVLLVYDDRDRPSGIPD
RFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSRDQAVIFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP
SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQ
WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTIAPTECS

PreF N67I E161P S215P E487Q, RSV A2, фибритин (SEQ ID NO: 90)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
KTNVTLSKKRKRRFLGFLLVGSAIASGVAVSKVLHLPGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSV
LTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYM
LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
NLCNVDFINPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVS
NKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSDQFDASISQVNEKINQSLAFIR
KSEDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

PreF N67I E161P S215P, RSV A2, фибритин (SEQ ID NO: 91)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
KTNVTLSKKRKRRFLGFLLVGSAIASGVAVSKVLHLPGEVNKIKSALLSTNKAVVSLSNGVSV
LTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYM
LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
NLCNVDFINPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVS
NKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIR
KSEDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

PreF N67I S173P S215P, RSV A2, фибритин (SEQ ID NO: 92)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
KTNVTLSKKRKRRFLGFLLVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLPTNKAVVSLSNGVSV
LTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYM
LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
NLCNVDFINPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVS
NKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIR

KSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

PreF N67I S182P S215P, RSV A2, фибритин (SEQ ID NO: 93)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
 KTNVTLSKKRKRRLGFLGVSASIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLPNGVSV
 LTSKVLDLKNYIDKQLLPVKNQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDGWCNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGNCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIR
 KSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

PreF N67I S215P D486C E487C, RSV A2, фибритин (SEQ ID NO: 94)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
 KTNVTLSKKRKRRLGFLGVSASIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNSGVSV
 LTSKVLDLKNYIDKQLLPVKNQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDGWCNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGNCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSCCFDASISQVNEKINQSLAFIR
 KSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный полипептид слияния (F) респираторно-синцитиального вируса (RSV) перед слиянием, содержащий по меньшей мере один эпитоп, который является специфичным для конформации F-белка перед слиянием и распознается специфическим моноклональным антителом, содержащим CDR1-участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 54, CDR2-участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 55, CDR3-участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 56 и CDR1-участок легкой цепи SEQ ID NO: 62, CDR2-участок легкой цепи SEQ ID NO: 63 и CDR3-участок легкой цепи SEQ ID NO: 64, и/или специфичным моноклональным антителом, содержащим CDR1-участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 58, CDR2-участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 59, CDR3-участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 60 и CDR1-участок легкой цепи SEQ ID NO: 66, CDR2-участок легкой цепи SEQ ID NO: 67 и CDR3-участок легкой цепи SEQ ID NO: 68, где полипептид содержит домен F1 и домен F2, и по меньшей мере одну замену, по сравнению с доменами F1 и F2 дикого типа, выбранную из группы, состоящей из:

- (a) замены аминокислотного остатка Е в положении 161 в Р, Q или G (E161P, E161Q или E161G);
- (b) замены аминокислотного остатка S в положении 182 в Р (S182P);
- (c) замены аминокислотного остатка S, Т или N в положении 173 в Р (S173P), а также
- (d) замены аминокислотного остатка D в положении 486 в С (D486C) в комбинации с заменой аминокислотного остатка D в положении 489 в С (D489C) SEQ ID NO: 1 из штамма А2.

2. F-полипептид RSV по п.1, отличающийся тем, что является тримером.

3. F-полипептид RSV по п.1 или 2, где полипептид дополнительно содержит замену аминокислотного остатка в положении 67 и/или мутацию аминокислотного остатка в положении 215.

4. F-полипептид RSV по п.3, включающий замену аминокислотного остатка N или Т в положении 67 и/или замену аминокислотного остатка S в положении 215.

5. F-полипептид RSV по любому из предыдущих пунктов, включающий связывающую последовательность, содержащую от 1 до 10 аминокислот, связывающих домен F1 и домен F2.

6. F-полипептид RSV по любому из предыдущих пунктов, где полипептид содержит усеченный домен F1.

7. F-полипептид RSV по п.6, где полипептид содержит гетерологичный домен тримеризации, свя-

занный с указанным усеченным доменом F1.

8. F-полипептид RSV по п.7, где гетерологичный домен тримеризации содержит аминокислотную последовательность GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL (SEQ ID NO: 4).

9. F-полипептид RSV по п.8, где домен тримеризации связан с аминокислотным остатком 513 F-белка RSV.

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

11. F-полипептид RSV по любому из предыдущих пунктов 1-9, где домен F1 и/или домен F2 происходят из штамма RSV B.

12. F-полипептид RSV по любому из предыдущих пунктов, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 90 - SEQ ID NO: 94.

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

14. Молекула нуклеиновой кислоты по п.13, оптимизированная по кодону для экспрессии в клетках млекопитающих.

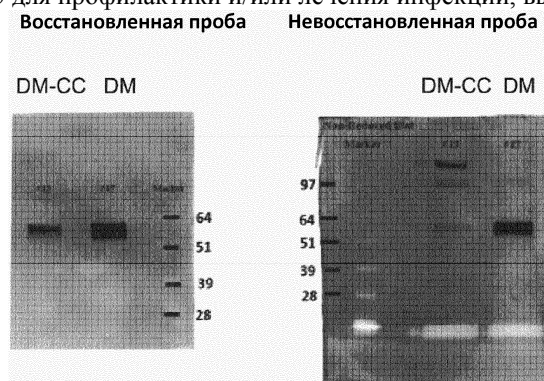
15. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.13 или 14.

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

17. Применение F-полипептида RSV по любому из пп.1-12, молекулы нуклеиновой кислоты по п.13 или 14 и/или вектора по п.15 для индуцирования иммунного ответа против F-белка RSV.

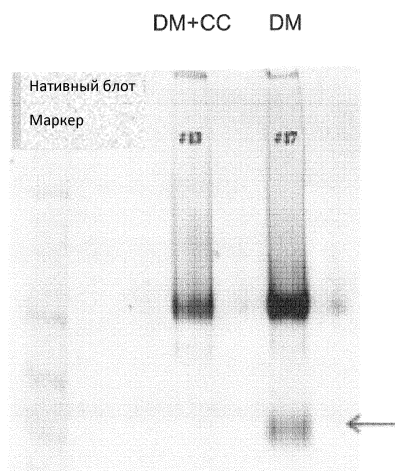
18. Применение F-полипептида RSV по любому из пп.1-12, молекулы нуклеиновой кислоты по п.13 или 14 и/или вектора по п.15 в качестве вакцины.

19. Применение F-полипептида RSV по любому из пп.1-12, молекулы нуклеиновой кислоты по п.13 или 14 и/или вектора по п.15 для профилактики и/или лечения инфекции, вызванной RSV.

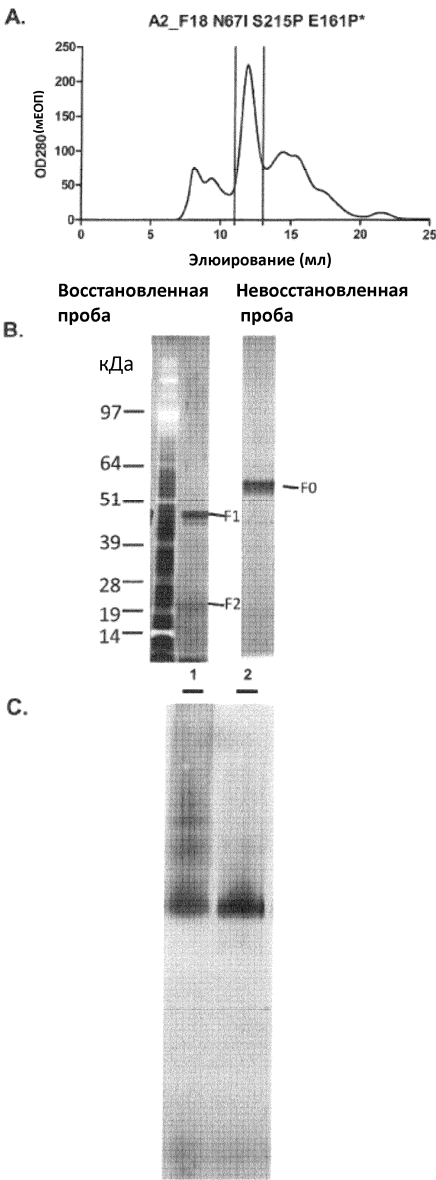


Фиг. 1

Анализ NativePAGE



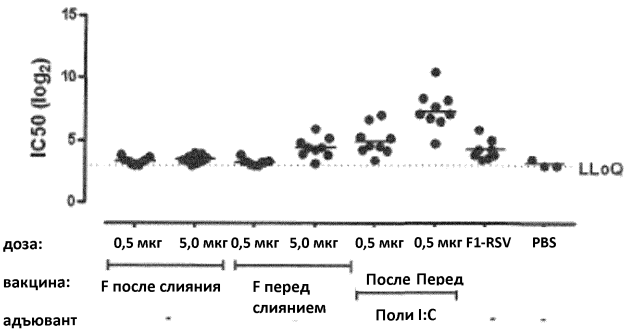
Фиг. 2



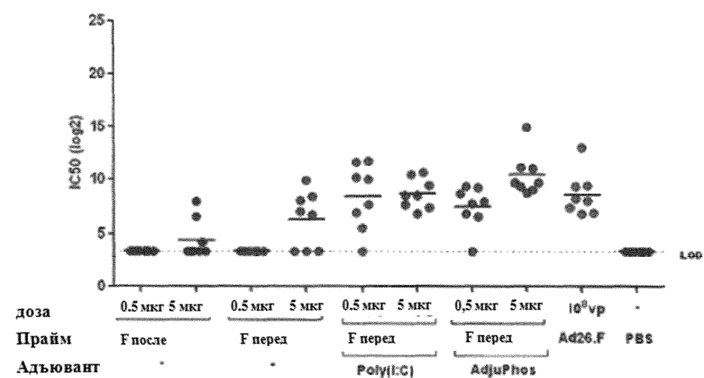
Фиг. 3

IVMP 307700113

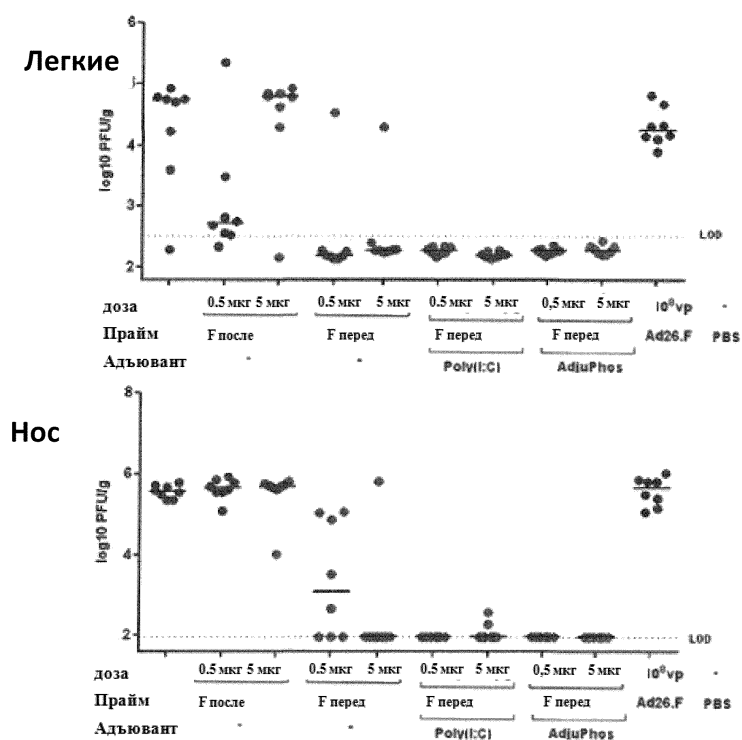
RSV длинный, t=6 мкс



Фиг. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6