

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **039065**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.11.29**

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

(21) Номер заявки  
**201890220**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.07.07**

---

(54) **ВАКЦИНА ПРОТИВ RSV**

---

(31) **15175647.5**

(32) **2015.07.07**

(33) **EP**

(43) **2018.06.29**

(86) **PCT/EP2016/066098**

(87) **WO 2017/005844 2017.01.12**

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

(56) **WO-A1-2014160463**

**US-A1-2014271699**

**WO-A1-03040178**

**WO-A1-2014202570**

**WO-A1-2014174018**

**J. S. MCLELLAN ET.AL. "Strukture of RSV Fusion Glycoprotein Trimer Bound to a Prefusion-Specific Neutralizing Antibody", SCIENCE, vol. 340, no. 6136, 25 April 2013 (2013-04-25), pages 1113-1117, XP055132644, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1234914 the whole document**

(72) Изобретатель:  
**Лангедейк Йоханнес (NL), Ройманс  
Дирк Андре Эмми (BE)**

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

---

(57) Изобретение относится к композициям, содержащим рекомбинантный полипептид слияния (F) респираторно-синцитиального вируса (RSV), который является стабилизированным в конформации до слияния, где указанный F-полипептид RSV содержит по меньшей мере одну мутацию по сравнению с F-полипептидом RSV дикого типа, при этом по меньшей мере одна мутация выбрана из группы, состоящей из а) мутации аминокислоты аспарагиновой кислоты (D) в положении 486, б) мутации аминокислоты аспарагиновой кислоты (D) в положении 489 и с) мутации аминокислоты серина (S) в положении 398 и/или аминокислоты лизина (K) в положении 394. Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую указанные стабильные F-полипептиды RSV.

---

**B1**

**039065**

**039065**

**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области медицины. Более конкретно, настоящее изобретение относится к вакцинам против RSV.

### Предпосылки к созданию изобретения

После открытия респираторно-синцитиального вируса (RSV) в 1950-х этот вирус вскоре был признан патогеном, ассоциированным с инфекциями верхних и нижних дыхательных путей у людей. По оценкам в мире ежегодно регистрируют 64 миллиона случаев инфекции RSV, которые приводят к 160000 смертельных случаев (WHO Acute Respiratory Infections Update September 2009). Наиболее тяжело заболевание протекает, в частности, у недоношенных детей, пожилых индивидуумов и индивидуумов с ослабленным иммунитетом. У детей моложе 2-х лет RSV является наиболее распространенным патогеном дыхательных путей, ответственным за приблизительно 50% случаев госпитализации вследствие респираторных инфекций, причем пик госпитализаций приходится на возраст 2-4 месяцев. Сообщалось, что практически все дети к двухлетнему возрасту были инфицированы RSV. Повторные инфекции в течение жизни связаны с малоэффективным врожденным иммунитетом. У людей пожилого возраста тяжесть заболевания, вызванного RSV, является аналогичной таковой, которую отмечают в случае непандемичных инфекций вирусом гриппа А.

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

В настоящее время вакцина против инфекции RSV отсутствует, но она требуется из-за высокой тяжести заболевания. Гликопротеин слияния (RSV F) RSV представляет собой перспективный вакцинный антиген, поскольку, как упомянуто выше, он является ключевой мишенью для нейтрализующих антител сыворотки крови человека. Таким образом, нейтрализующее моноклональное антитело к RSV F (павилизумаб) может предупреждать тяжелое течение заболевания и оно было одобрено для применения с целью профилактики у младенцев.

F RSV подвергает слиянию мембраны вируса и мембраны клетки-хозяина путем необратимого рефолдинга белка из лабильной конформации до слияния до стабильной конформации после слияния. Структуры обеих конформации были определены для F RSV (McLellan JS, et al. Science 342, 592-598 (2013); McLellan JS, et al. Nat Struct Mol Biol 17, 248-250 (2010); McLellan JS, et al. Science 340, 1113-1117 (2013); Swanson KA, et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 9619-9624 (2011)), а также для белков слияния из родственных парамиксовирусов, обеспечивая возможность более глубокого изучения механизма этого сложного процесса слияния. Подобно другим белкам слияния типа I, для неактивного предшественника F<sub>0</sub> RSV требуется расщепление с помощью фурина-подобной протеазы в ходе внутриклеточного созревания. F RSV содержит два сайта для фурина, которые соответствуют трем полипептидам: F2, p27 и F1, причем последний содержит гидрофобный пептид слияния (FP) на своем N-конце. Для рефолдинга из конформации до слияния в конформацию после слияния участок рефолдинга 1 (RR1) между остатком 137 и 216, который включает FP и гептадный повтор А (HRA), подлежит трансформации из сборки спиралей, петель и нитей в длинную непрерывную спираль. FP, расположенный в N-концевом сегменте RR1, в дальнейшем способен вытягиваться от мембраны вируса и встраиваться в проксимальный участок мембраны целевой клетки. Далее участок рефолдинга 2 (RR2), который образует C-концевую петлю в шиловидном отростке F до слияния и включает гептадный повтор В (HRB), перемещается на другую сторону головки F RSV и связывает суперспиральный тример HRA с доменом HRB с образованием пучка из шести спиралей. Образование суперспиральной структуры RR1 и перемещение RR2 для завершения образования пучка из шести спиралей представляют собой наиболее значительные структурные изменения, которые происходят в ходе процесса рефолдинга.

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

### Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим стабилизированные рекомбинантные полипептиды слияния (F) респираторно-синцитиального вируса (RSV) до слияния, т.е. рекомбинантные F-полипептиды RSV, которые являются стабильными в конформации до слияния. F-полипептиды RSV по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один эпитоп, который является специфичным к конформации F-белка до слияния. В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния являются растворимыми F-полипептидами RSV до слияния.

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие стабильные F-полипептиды RSV до слияния.

В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты кодируют полноразмерный мембраносвязанный F-белок RSV, который является стабилизированным в конформации до слияния. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты кодируют растворимые стабилизированные F-полипептиды RSV до слияния.

В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты присутствуют в векторе. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая F-полипептид RSV, является кодон-оптимизированной для экспрессии в клетках человека.

Настоящее изобретение дополнительно относится к описанным в настоящем описании композициям для применения в индукции иммунного ответа на F-белок RSV, в частности для применения в качестве вакцины.

Настоящее изобретение также относится к способам индукции у пациента иммунного ответа на респираторно-синцитиальный вирус (RSV), включающим введение пациенту эффективного количества описанной в настоящей описании композиции. Предпочтительно индуцированный иммунный ответ характеризуется выработкой нейтрализующих антител к RSV и/или защитным иммунитетом против RSV. В конкретных аспектах настоящего изобретения относится к способу индукции у пациента выработки антител к F-белку респираторного синцитиального вируса (RSV), включающему введение пациенту эффективного количества композиции, содержащей F-полипептид RSV до слияния, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую упомянутый F-полипептид RSV, и/или вектор, содержащий молекулу упомянутой нуклеиновой кислоты.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу вакцинации пациента против RSV, включающему введение пациенту композиции в соответствии с настоящим изобретением.

В некоторых вариантах осуществления композиции вводят внутримышечно.

В некоторых вариантах осуществления композицию в соответствии с настоящим изобретением вводят пациенту более одного раза.

Настоящее изобретение также относится к способу уменьшения инфицирования и/или репликации RSV, например, в носоглотке и легких пациента, включающему введение пациенту композиции в соответствии с настоящим изобретением. Это будет снижать негативные последствия, возникающие у пациента в результате инфекции RSV, и таким образом способствовать защите пациента от таких негативных последствий после введения вакцины. В некоторых вариантах осуществления негативные последствия инфекции, вызванной RSV, могут быть фактически предотвращены, т. е. снижены до таких низких уровней, которые не являются клинически значимыми.

#### **Краткое описание фигур**

На чертеже: мутации в F RSV, которые стабилизируют конформацию до слияния. Процент экспрессирующихся на поверхности мутантов F RSV, которые остаются в конформации до слияния после воздействия тепловым шоком с возрастающими температурами. Эксперименты проводили 2-5 раз при разных концентрациях. Если показаны планки погрешностей, то они представляют среднеквадратичное отклонение по меньшей мере для двух точек данных из независимых экспериментов.

#### **Подробное описание изобретения**

Белок слияния (F) респираторно-синцитиального вируса (RSV) участвует в слиянии мембраны вируса с мембраной клетки-хозяина, которая требуется для инфекции. МРНК F RSV транслируется в белок-предшественник из 574 аминокислот, обозначенный F<sub>0</sub>, который содержит сигнальную пептидную последовательность на N-конце (например, аминокислотные остатки 1-26 из SEQ ID NO: 1), которая удаляется сигнальной пептидазой в эндоплазматическом ретикулуме. F<sub>0</sub> расщепляется по двум сайтам (между аминокислотными остатками 109/110 и 136/137) с помощью клеточных протеаз (в частности, фурином) в транс-Гольджи, при этом удаляется короткая гликозилированная вставочная последовательность (также обозначенная как участок p27, содержащий аминокислотные остатки от 110 до 136), и образуется 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 (TM) (аминокислотные остатки 530-550) и цитоплазматический участок (аминокислотные остатки 551-574). Домен F2 (аминокислотные остатки 27-109) ковалентно связан с F1 двумя дисульфидными мостиками. Гетеродимеры F1-F2 подвергаются сборке в вирионе в виде гомотримеров.

Вакцины против инфекции RSV в настоящее время не существует, хотя и является желательной. Антитела с наивысшей нейтрализующей активностью в сыворотке крови человека направлены против конформации до слияния, однако, из-за их нестабильности конформация до слияния обладает склонностью к преждевременному рефолдингу в конформацию после слияния, как в жидкой среде, так и на поверхности вирионов.

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащие стабильный рекомбинантный F-полипептид RSV до слияния, т. е. F-полипептид RSV, который является стабилизированным в конформации до слияния, где указанный F-полипептид RSV содержит по меньшей мере одну мутацию по сравнению с F-полипептидом RSV дикого типа, при этом по меньшей мере одна мутация выбрана из группы, состоящей из а) мутации аминокислоты аспарагиновой кислоты (D) в положении 486, b) мутации аминокислоты аспарагиновой кислоты (D) в положении 489 или c) мутации аминокислоты серина (S) в поло-

жении 398 и/или аминокислоты лизина (K) в положении 394.

В некоторых вариантах осуществления F-полипептид RSV представляет собой растворимый полипептид RSV.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композициям, содержащим выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую описанный в настоящем описании F-полипептид RSV, т.е. кодирующую F-полипептид RSV, который содержит по меньшей мере одну мутацию по сравнению с F-полипептидом RSV дикого типа, при этом по меньшей мере одна мутация выбрана из группы, состоящей из а) мутации аминокислоты аспарагиновой кислоты (D) в положении 486, б) мутации аминокислоты аспарагиновой кислоты (D) в положении 489 или с) мутации аминокислоты серина (S) в положении 398 и/или аминокислоты лизина (K) в положении 394.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует полноразмерный мембраносвязанный F-белок RSV, который является стабилизированным в конформации до слияния. После введения данной композиции полноразмерный белок RSV, экспрессируемый с упомянутой молекулы нуклеиновой кислоты, будет присутствовать на клеточной мембране клеток пациента, которому была введена данная композиция.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует растворимый F-полипептид RSV.

В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды в соответствии с настоящим изобретением, являются кодон-оптимизированными для экспрессии в клетках млекопитающих, предпочтительно в клетках человека. Способы кодон-оптимизации известны и были описаны ранее (например, WO 96/09378). Последовательность считается кодон-оптимизированной, если по меньшей мере один кодон, не являющийся предпочтительным, по сравнению с последовательностью дикого типа замещен кодоном, который является более предпочтительным. В настоящем описании кодон, не являющийся предпочтительным, представляет собой кодон, который используется с меньшей частотой 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, как, например, на вебсайте <http://www.kazusa.or.jp/codon>. Предпочтительно более одного кодона, не являющегося предпочтительным, предпочтительно большинство или все кодоны, не являющиеся предпочтительными, замещают кодонами, которые являются более предпочтительными. Предпочтительно наиболее часто используемые кодоны в организме используют в кодон-оптимизированной последовательности. Как правило, замещение предпочтительными кодонами приводит к более высокой экспрессии.

Специалисту в данной области будет понятно, что несколько различных молекул полинуклеотидов и нуклеиновой кислоты могут кодировать один и тот же полипептид в результате вырожденности генетического кода. Также понятно, что специалисты в данной области могут при помощи традиционных методов проводить нуклеотидные замены, которые не влияют на последовательность полипептида, кодируемую молекулами нуклеиновой кислоты, для отражения частоты использования кодонов в любом конкретном организме-хозяине, в котором полипептиды будут экспрессироваться. Следовательно, если конкретно не указано иное, то "нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность" включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности, которые кодируют белки и РНК, могут включать в себя или могут не включать в себя интроны.

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

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты является частью вектора. Таким образом, настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим вектор, содержащий описанную выше молекулу нуклеиновой кислоты. С такими векторами можно легко производить манипуляции с использованием способов, хорошо известных специалисту в данной области, и их, например, можно разработать так, чтобы они были способны к репликации в прокариотических и/или эукариотических клетках. Альтернативно векторы сконструированы как неспособные к репликации. Подходящими векторами в соответствии с настоящим изобретением являются, например, аденовекторы, в том числе Ad26 или AD35, альфавирус, парамиксовирус, вирус осповакцины, вирус герпеса, ретровирусные векторы и т. д. Специалист в данной области способен выбрать подходящие векторы экспрессии и вставить последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению функциональным образом.

В соответствии с настоящим изобретением неожиданно было обнаружено, что описанные в настоящем описании мутации, или по отдельности, или в комбинации, способны стабилизировать F-белок RSV в конформации до слияния. F-полипептиды RSV, присутствующие в композициях по настоящему

изобретению, таким образом содержат по меньшей мере одну мутацию по сравнению с F-белком RSV дикого типа, в частности с F-белком RSV под SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления стабильные F-полипептиды RSV представляют собой полноразмерный F-белок RSV. В соответствии с настоящим изобретением полноразмерный F-белок RSV не присутствует в вирионе RSV. Таким образом, настоящее изобретение относится к рекомбинантно экспрессируемым F-полипептидам RSV.

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

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один эпитоп, который распознается специфическим моноклональным антителом до слияния, содержащим CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 4, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 5, CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6 и CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 7, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 8 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 9 (далее в этом документе упоминаемый как CR9501), и/или специфическим моноклональным антителом до слияния, содержащим CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 10, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 11, CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 12 и CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 13, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 14 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 15 (упоминаемый как CR9502). CR9501 и CR9502 содержат переменные участки тяжелой и легкой цепи, и таким образом соответственно специфичности связывания антител 58C5 и 30D8, которые, как было показано ранее, специфично связываются с F-белком RSV в его конформации до слияния, но не в конформации после слияния (см. WO2012/006596).

В некоторых вариантах осуществления F-полипептид RSV до слияния содержит мутацию остатка аминокислоты аспарагиновой кислоты (D) в положении 486 в аспарагин (N) (D489Y).

В некоторых вариантах осуществления F-полипептид RSV до слияния содержит мутацию остатка аминокислоты аспарагиновой кислоты (D) в положении 489 в тирозин (Y) (D489Y).

В некоторых вариантах осуществления стабильный F-полипептид RSV до слияния в соответствии с настоящим изобретением содержит мутацию аминокислотного остатка серина (S) в положении 398 в лейцин (L) S398L) и/или мутацию аминокислотного остатка лизина (K) в положении 394 в аргинин (R) (K394R). В некоторых вариантах осуществления стабильный F-полипептид RSV до слияния содержит мутацию аминокислотного остатка серина (S) в положении 398 в лейцин (L) S398L) и мутацию аминокислотного остатка лизина (K) в положении 394 в аргинин (R) (K394R).

В соответствии с настоящим изобретением неожиданно было показано, что данные мутации способны стабилизировать F-белок RSV в конформации до слияния, в частности, когда F-белок RSV является полноразмерным мембраносвязанным F-белком RSV.

В некоторых вариантах осуществления стабилизированные F-полипептиды RSV представляют собой растворимые F-полипептиды RSV.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусматриваются композиции, содержащие стабильные растворимые F-полипептиды RSV до слияния. В некоторых вариантах осуществления проводили усечение F-белка RSV путем делеции трансмембранного (TM) и цитоплазматического участков с получением растворимого секретируемого F-белка (sF). Поскольку участок TM отвечает за заякоривание в мембране и тримеризацию, незаякоренный растворимый F-белок является в значительной степени более лабильным, чем полноразмерный белок, и он будет с легкостью подвергаться рефолдингу в конечное состояние после слияния. Для получения растворимого F-белка в стабильной конформации до слияния, которая демонстрирует высокие уровни экспрессии и высокую стабильность, необходимо таким образом стабилизировать конформацию до слияния. Растворимые F-полипептиды RSV, которые стабилизированы C-концевым гетерологичным доменом тримеризации и двумя стабилизирующими мутациями в верхушке белка, были описаны в патентных документах WO 2014/174018 и WO2014/202570. В частности, было показано, что мутации N671 и S215P были способны к стабилизации растворимых рекомбинантных F-полипептидов RSV в конформации до слияния. Модификации в соответствии с настоящим изобретением дополнительно стабилизируют растворимые F-белки RSV, как описано в патентных документах WO 2014/174018 и WO2014/202570.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения относится к композициям, содержащим растворимый F-полипептид RSV до слияния, где F-полипептид RSV содержит по меньшей мере одну из описанных выше модификаций в комбинации с мутацией аминокислотного остатка аспарагина (N) или треонина (T) в положении 67 и/или мутацию аминокислотного остатка серина (S) в положении 215.

В некоторых вариантах осуществления растворимые F-полипептиды RSV до слияния в композициях по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну из описанных выше мутаций в комбинации с мутацией аминокислотного остатка аспарагина (N) или треонина (T) в положении 67 в изолейцин (I) (N/T67I) в I и/или мутацией аминокислотного остатка серина (S) в положении 215 в пролин (P) (S215P).

В некоторых вариантах осуществления растворимые F-полипептиды RSV до слияния дополнительно содержат гетерологичный домен тримеризации, связанный с усеченным доменом F1, что описано в патентных документах WO2014/174018 и WO2014/202570. В рамках изобретения, "усеченный" домен F1 относится к домену F1, который не является полноразмерным доменом F1, т. е. в котором 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 тримеризации содержит SEQ ID NO: 3 и связан с аминокислотным остатком 513 домена F1 RSV или непосредственно, или посредством линкера.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность SAIG.

Известно, что RSV существует в виде единственного серотипа, имеющего две антигенные подгруппы: A и B. Аминокислотные последовательности зрелых процессированных F-белков двух групп являются идентичными на приблизительно 93%. В рамках настоящей заявки, положения аминокислот приведены по отношению к последовательности F-белка RSV из штамма A2 (SEQ ID NO: 1). Используемое 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 во всей данной заявке, 1 относится к N-концевой аминокислоте незрелого FO-белка (SEQ ID NO: 1). При использовании штамма RSV, отличного от штамма A2, положения аминокислот в F-белке следует нумеровать по отношению к нумерации в F-белке штамма A2 SEQ ID NO: 1 посредством 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 в данной области, например с помощью CLUSTALW, Bioedit или CLC Workbench.

Аминокислота в соответствии с настоящим изобретением может быть любой из двадцати встречающихся в природе (или 'стандартных' аминокислот) или их вариантов, как, например, D-аминокислоты (D-энантиомеры аминокислот с хиральным центром), или любыми вариантами, которые не встречаются в природе в белках, как, например, норлейцин. Стандартные аминокислоты можно разделить на несколько групп по их свойствам. 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, как, например, цистеин, который может образовывать ковалентные дисульфидные связи (или дисульфидные мостики) с другими цистеиновыми остатками, пролин, который индуцирует повороты полипептидного остова, и глицин, который является более гибким, чем другие аминокислоты. В табл. 1 приведены сокращения и свойства стандартных аминокислот.

Специалист примет во внимание, что мутации можно осуществлять с белком при помощи стандартных методик молекулярной биологии. F-полипептиды RSV до слияния в композициях в соответствии с настоящим изобретением являются стабильными, т. е. не происходит немедленного перехода в конформацию после слияния при обработке полипептидов, как, например, при очистке, циклах замораживания-оттаивания и/или хранении и т.д.

В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния в соответствии с настоящим изобретением характеризуются повышенной стабильностью при воздействии теплом по сравнению с F-полипептидами RSV без указанной(указанных) мутации(мутаций). В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния термостабильны по меньшей мере в течение 10 минут при температуре 55°C, предпочтительно при 58°C, более предпочтительно при 60°C. "Термостабильный" означает, что полипептиды по-прежнему демонстрируют по меньшей мере один специфический эпитоп до слияния после того, как их подвергали воздействию по меньшей мере в течение 10 минут повышенной температуры (например, температуры 55°C или выше), например, как определено с использованием способа, описанного в примере 1.

В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV получены из штамма A RSV. В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV получены из штамма A2 RSV с SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV получены из штамма B RSV. В некоторых вариантах осуществления домен F1 и/или F2 происходят из штамма B RSV SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления F-полипептид RSV до слияния по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21-26.

В рамках настоящей заявки, нуклеотидные последовательности представлены в направлении от 5' до 3', а аминокислотные последовательности от N-конца к C-концу, как принято в данной области.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержат лидерную последовательность, также называемую сигнальной последовательностью или сигнальным пептидом, соответствующую аминокислотам 1-26 в SEQ ID NO: 1 или аминокислотам 1-26 в SEQ ID NO: 2. Она представляет собой короткий (длиной, как правило, составляющей 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 некоторых вариантах осуществления полипептиды содержат His-метку. His-метка или полигистидиновая метка представляет собой аминокислотный мотив в белках, который состоит из по меньшей мере пяти остатков (H) гистидина, часто на N- или C-конце белка, который обычно используют для целей очистки.

Как описано в настоящем описании, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим стабильный F-полипептид RSV до слияния, т. е., F-полипептид RSV, который демонстрирует эпитоп, присутствующий в конформации до слияния F-белка RSV, но отсутствующий в конформации после слияния, и/или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую такой стабильный F-полипептид RSV до слияния.

Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям, содержащим описанные в настоящем описании F-полипептид RSV до слияния, молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор, а также 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 пациентов, которым их вводят. Такие фармацевтически приемлемые носители и наполнители хорошо известны в данной области (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] и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). F-полипептиды RSV или молекулы нуклеиновой кислоты предпочтительно составляют и вводят в виде стерильного раствора, хотя в некоторых случаях также может быть предусмотрена возможность использования лиофилизированных препаратов. Стерильные растворы получают при помощи стерилизующей фильтрации или с помощью других способов, известных per se в данной области. Затем растворы лиофилизируют или расфасовывают в контейнеры, предназначенные для лекарственных форм. Показатель pH раствора обычно находится в диапазоне pH от 3,0 до 9,5, например pH от 5,0 до 7,5. F-полипептиды RSV, как правило, находятся в растворе, содержащем подходящий фармацевтически приемлемый буфер, а композиция также может содержать соль. В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV можно составлять в виде инъекционного препарата.

Дополнительно изобретение относится к способам индукции у пациента иммунного ответа на F-белок RSV, включающим введение пациенту эффективного количества композиции в соответствии с настоящим изобретением. Также изобретение относится к композициям в соответствии с настоящим изобретением для применения в индукции иммунного ответа на F-белок RSV, в частности, для применения в качестве вакцины. Дополнительно изобретение относится к применению композиций в соответствии с настоящим изобретением в получении лекарственного средства для применения в индукции у пациента иммунного ответа на F-белок RSV. Предпочтительно, индуцированный иммунный ответ характеризуется выработкой нейтрализующих антител к RSV и/или защитным иммунитетом против RSV.

Настоящее изобретение в конкретных аспектах относится к способу индукции у пациента нейтрализующих антител к F-белку респираторно-синцитиального вируса (RSV), включающему введение пациенту эффективного количества описанной в настоящем описании композиции.

Настоящее изобретение также относится к способу уменьшения инфицирования и/или репликации RSV, например в носоглотке и легких пациента, включающему введение пациенту композиции в соответствии с настоящим изобретением. Это будет снижать неблагоприятные эффекты, возникающие у пациента в результате инфекции, вызванной RSV, и таким образом за счет введения вакцины способствовать защите пациента от таких негативных последствий. В некоторых вариантах осуществления негативных последствия инфекции RSV могут быть фактически предотвращены, т.е. снижены до таких низких уровней, что они не будут клинически значимыми.

Композиции по настоящему изобретению можно использовать для предупреждения (профилактики) и/или для лечения инфекций, вызванных RSV. В некоторых вариантах осуществления профилактика и/или лечение может быть направлено на группы пациентов, которые восприимчивы к инфекции, вызываемой RSV. Такие группы пациентов включают без ограничения, например, пожилых (например, в возрасте  $\geq 50$  лет, в возрасте  $\geq 60$  лет и предпочтительно в возрасте  $\geq 65$  лет), молодых (например, в возрасте  $\leq 5$  лет, в возрасте  $\leq 1$  года), госпитализированных пациентов и пациентов, которые получали лечение противовирусным соединением, но продемонстрировали неудовлетворительный противовирусный ответ.

Композиции в соответствии с настоящим изобретением можно использовать, например, в отдельном лечении и/или профилактике заболевания или состояния, вызванного RSV, или в комбинации с дру-

гими профилактическими и/или терапевтическими средствами лечения, такими как (существующими или будущими) вакцины, противовирусные средства и/или моноклональные антитела.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способам профилактики и/или лечения у пациента инфекции, вызванной RSV, за счет использования композиций в соответствии с настоящим изобретением. В конкретном варианте осуществления способ профилактики и/или лечения у пациента инфекции, вызванной RSV, включает введение пациенту композиций, содержащих эффективное количество описанных выше F-полипептида RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектора. 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. Профилактика 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, в рамках изобретения, может относиться к уменьшению видимых или ощутимых симптомов заболевания, вирусемии или других поддающихся измерению проявлений инфекции гриппа.

В некоторых вариантах осуществления композиции в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержат один или несколько адъювантов. Адъюванты, как известно в данной области, дополнительно повышают иммунный ответ в отношении применяемой антигенной детерминанты. Выражения "адъювант" и "иммуностимулятор" используются в настоящем описании 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-водные эмульсии, такие 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 А (MPL), 3-О-деацелированный MPL (3dMPL), олигонуклеотиды, содержащие мотив CpG, ADP-рибозилирующие токсины бактерий или их мутантные формы, такие как термолabileный 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 т. д.)), которые стимулируют иммунный ответ при взаимодействии с клетками реципиентов. В некоторых 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, составляющих 0,05-5 мг, например 0,075-1,0 мг алюминия на дозу.

В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению предназначены для применения в качестве вакцины против респираторно-синциального вируса (RSV). Термин "вакцина" относится к композиции, содержащей активный компонент, который является эффективным для индукции у пациента определенной степени иммунитета против определенного патогенного микроорганизма или заболевания, 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 до слияния и/или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей F-полипептид RSV до слияния, и/или вектор, содержащий указанную молекулу нуклеиновой кислоты, что вызывает формирование иммунного ответа на F-белок RSV. Эта вакцина может быть использована для предупреждения тяжелого заболевания нижних дыхательных путей, приводящего к госпитализации, и она снижает частоту осложнений, таких как пневмония и бронхолит, возникающих вследствие инфекции и репликации RSV у пациента. В некоторых вариантах осуществления вакцина может представлять собой комбинированную вакцину, которая дополнительно содержит другие компоненты, которые индуцируют иммунный ответ, например на другие белки RSV и/или на другие возбудители инфекции. Введение дополнительных активных компонентов можно, к примеру, осуществлять путем отдельного введения или путем введения комбинации продуктов-вакцин по настоящему изобретению и дополнительных активных компонентов.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу вакцинации пациента против RSV, включающему введение пациенту композиции в соответствии с настоящим изобретением.

Композиции в соответствии с настоящим изобретением можно вводить пациенту, например пациенту-человеку. 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 внутривенное, внутримышечное, подкожное, чрескожное введение или введение через слизистые, например, интраназальное, пероральное и т.п. В одном варианте осуществления

композиция вводится путем внутримышечной инъекции. Специалисту известны различные возможности введения композиции, например вакцины, для индукции иммунного ответа к антигену(антигенам), присутствующему(присутствующим) в вакцине. В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению вводится внутримышечно.

Пациент, в рамках изобретения, предпочтительно представляет собой млекопитающее, к примеру грызуна, например мышь, хлопкового хомяка или примата, отличного от человека, или человека. Предпочтительно, пациентом является пациент-человек.

Композиции по настоящему изобретению можно также вводить или в виде прайма, или в виде буста в гомологичном или гетерологичном режиме прайм-буст. При проведении бустерной вакцинации, как правило, такую бустерную вакцину будут вводить одному и тому же пациенту с промежутком от одной недели до одного года, предпочтительно от двух недель до четырех месяцев после введения композиции пациенту в первый раз (которое в данном случае называется "примирующей вакцинацией"). В некоторых вариантах осуществления введение предусматривает прайм и по меньшей мере одно бустерное введение.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу стабилизации F-полипептида RSV в конформации до слияния, включающему введение в F-белок RSV мутации по сравнению с F-белком RSV дикого типа, при этом выбирают одну или несколько мутаций из группы, состоящей из стабилизированных F-полипептид RSV до слияния, получаемых и/или полученных с помощью такого способа, также образующих часть настоящего изобретения, а также к описанным выше вариантам их применения.

Настоящее изобретение дополнительно поясняется в приведенных далее примерах. Примеры не ограничивают настоящее изобретение каким-либо образом. Они служат лишь для пояснения настоящего изобретения.

### Примеры

Пример 1. Получение стабильных F-полипептидов RSV до слияния.

Терапевтические малые молекулы, которые связывают F-белок респираторно-синцитиального вируса (RSV), ингибируют слияние мембран и связывание с 3-складчатым симметричным карманом в пределах центральной полости метастабильного F RSV в конформации до слияния. Ингибиторное связывание стабилизирует данную конформацию путем связывания двух участков, которые необходимо подвергнуть большой структурной перестройке для облегчения слияния мембран. В соответствии с настоящим изобретением неожиданно были выявлены "ускользающие" мутации, которые парадоксальным образом стабилизируют конформацию до слияния. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением было показано, что аминокислотные замены, соответствующие данному классу "ускользающих" мутаций, можно использовать для стабилизации F RSV в конформации до слияния.

В данном исследовании, которое привело к настоящему изобретению, анализ активации при воздействии температурой разработали для оценки влияния мутаций на стабильность F-белка до слияния. Клетки HEK293, экспрессирующие F RSV дикого типа или мутантный F RSV, подвергали тепловому шоку при увеличивающихся температурах в течение 10 мин, за счет чего можно было определить кривую плавления. Такие мутации, как вариант D489Y, по сути, повышали температуру, требующуюся для активации (фиг. 1), свидетельствуя таким образом о том, что мутации стабилизировали F-полипептид RSV. Полноразмерные F-белки RSV (дикого типа и содержащие одну или несколько мутаций в соответствии с настоящим изобретением) временно экспрессировались в клетках HEK293T. Спустя 48 ч после трансфекции клетки отделяли с использованием EDTA-содержащего буфера и подвергали тепловому шоку в течение 10 мин. Клетки окрашивали антителами, конъюгированными с AlexaFluor647, которые являлись специфичными либо к F RSV до слияния (антитело CR9501), либо распознавали обе конформации до и после слияния (антитело CR9503, которое содержит вариабельные участки тяжелой и легкой цепи антитела мотавизумаба к F RSV). Йодид пропидия (Invitrogen) использовали в качестве красителя для выявления живых-мертвых штаммов, при этом клетки подвергали анализу с использованием инструмента для проточной цитометрии FACS Canto II instrument (BD Biosciences). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo 9.6, и рассчитывали показатели средней интенсивности флуоресценции (MFI), при этом подвергали нормализации подвергнутые тепловому шоку образцы к необработанным образцам (37°C).

Конструкции синтезировали и подвергали кодон-оптимизации 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 проводили секвенирование.

Таблица 1. Стандартные аминокислоты, аббревиатуры и свойства

Аминокислота	3-буквенная	1-буквенная	Полярность боковой цепи	Заряд боковой цепи (рН 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 2

Анти-тело	Домен VH	CDR1 VH	CDR2 VH	CDR3 VH
<b>CR9501</b>	Аминокислоты 1-125 с SEQ ID NO: 16	GASINSDNYWWT (SEQ ID NO:4)	HISYTGNTYYTPSLKS (SEQ ID NO:5)	CGAYVLISNCGWFDS (SEQ ID NO:6)
<b>CR9502</b>	Аминокислоты 1-121 с SEQ ID NO: 18	GFTFSGHTIA (SEQ ID NO:10)	WVSTNNGNTEYAQKIQG (SEQ ID NO:11)	EWLVMGGFAFDH (SEQ ID NO:12)
Анти-тело	Домен VL	CDR1 VL	CDR2 VL	CDR3 VL
<b>CR9501</b>	Аминокислоты 1-107 с SEQ ID NO: 17	QASQDISTYLN (SEQ ID NO: 7)	GASNLET (SEQ ID NO:8)	QQYQYLPYT (SEQ ID NO:9)
<b>CR9502</b>	Аминокислоты 1-110 с SEQ ID NO: 19	GANNIGSQNVH (SEQ ID NO:13)	DDRDRPS (SEQ ID NO:14)	QVWDS SRDQAVI (SEQ ID NO:15)

**Последовательности**

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

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI  
 ELSNIKKKNCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRRELPRFMNYTLNNAK  
 KTNVTLSSKKRRRFLGFLLVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVKNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSV  
 LTSKVLDLKNIIDKQLLPVIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTTPVSTYM  
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK  
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV  
 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVS  
 NKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIR  
 KSDELLHNVNAVKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIA  
 FSN

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

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNI TEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITI  
 ELSNIKETKNCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARRREAPQYMYNTINTTK  
 NLNVSISKRRRRFLGFLLVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVKNIKNALLSTNKAVVSLNNGVSV  
 LTSKVLDLKNIINNQLLPVIVNQSCRISNIETVIEFQQKNSRLEINREFSVNAGVTTPLSTYM  
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWK  
 LHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV  
 SLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVS  
 NKGVDTVSVGNTLYYVVKLEGKNLYVKGEPIINNYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIR  
 RSEDELLHNVNTGKSTTNIMITTIIIVIIIVVLLSLIAIGLLLYCKAKNTPVTLSKDQLSGINNIA  
 FSK

**SEQ ID NO: 3**

GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

**CR9501, тяжелая цепь (SEQ ID NO: 16):**

QVQLVQSGPGLVKPSQTLALTCNVSGASINSDNYWTWIRQRPGGGLEWIGHISYTGNT  
 YYTPSLKSRLSMSLETSQSQFSLRLTSVTAADSAVYFCAACGAYVLISNCGWFDSWGQGTQVTV  
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPEVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL  
 YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

**CR9501, легкая цепь (SEQ ID NO: 17):**

EIVMTQSPSSLSASIGDRVITITCQASQDISTYLNWYQQKPGQAPRLLIYGASNLETGVP  
 SRFTGSGYGTDFSVTISSLQPEDIATYYCQQYQYLPYTFAPGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE

QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYE  
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**CR9502, тяжелая цепь (SEQ ID NO: 18):**

EVQLLQSGAELKKPGASVKISCKTSGFTFSGHTIAWVRQAPGQGLEWMGWSTNNGNTE  
YAQKIQGRVTMTMDTSTSTVYMELRSLTSDDTAVYFCAREWLVMGGFAFDHWGQGTLLTVSSAS  
TKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC

**CR9502, легкая цепь (SEQ ID NO: 19):**

QSVLTQASSVSVAPGQTARITCGANNIGSQNVHWYQQKPGQAPVLLVYDDRDRPSGIPD  
RFGSNGSNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRRDQAVIFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP  
SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQ  
WKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTIAPTECS

**Предшественник F, A2 RSV, фибритин (SEQ ID NO: 20)  
(растворимый, дикий тип с фибритином)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI  
ELSNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK  
KTNVTL SKKRKRRLGFL LGVGSIAISGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVLSNGVSV  
LTSKVL DLKNYIDKQLLP IVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYM  
LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK  
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV  
NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVS  
NKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIR  
KSD<sub>SAIG</sub>ELLGYIPEAPRDGQAYVRKDG<sub>EW</sub>VLLSTFL

**Предшественник F, A2 RSV, (SEQ ID NO: 21) D486N**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI  
ELSNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK  
KTNVTL SKKRKRRLGFL LGVGSIAISGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVLSNGVSV  
LTSKVL DLKNYIDKQLLP IVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYM  
LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK  
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV  
NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVS  
NKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSE<sub>N</sub>FDASISQVNEKINQSLAFIR  
KSD<sub>EL</sub>LLHNVNAVKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIA  
FSN

**Предшественник F, A2 RSV, (SEQ ID NO: 22) D489Y**

MELLILKANAI T T I L T A V T F C F A S G Q N I T E E F Y Q S T C S A V S K G Y L S A L R T G W Y T S V I T I  
 E L S N I K E N K C N G T D A K V K L I K Q E L D K Y K N A V T E L Q L L M Q S T P A T N N R A R R E L P R F M N Y T L N N A K  
 K T N V T L S K R K R R R F L G F L L G V G S A I A S G V A V S K V L H L E G E V N K I K S A L L S T N K A V V S L S N G V S V  
 L T S K V L D L K N Y I D K Q L L P I V N K Q S C S I S N I E T V I E F Q Q K N N R L L E I T R E F S V N A G V T T P V S T Y M  
 L T N S E L L S L I N D M P I T N D Q K K L M S N N V Q I V R Q Q S Y S I M S I I K E E V L A Y V V Q L P L Y G V I D T P C W K  
 L H T S P L C T T N T K E G S N I C L T R T D R G W Y C D N A G S V S F F P Q A E T C K V Q S N R V F C D T M N S L T L P S E V  
 N L C N V D I F N P K Y D C K I M T S K T D V S S S V I T S L G A I V S C Y G K T K T A S N K N R G I I K T F S N G C D Y V S  
 N K G V D T V S V G N T L Y Y V N K Q E G K S L Y V K G E P I I N F Y D P L V F P S D E F Y A S I S Q V N E K I N Q S L A F I R  
 K S D E L L H N V N A V K S T T N I M I T T I I I V I I V I L L S L I A V G L L L Y C K A R S T P V T L S K D Q L S G I N N I A  
 F S N

**Предшественник F, A2 RSV, (SEQ ID NO:23) S398L, K394R**

MELLILKANAI T T I L T A V T F C F A S G Q N I T E E F Y Q S T C S A V S K G Y L S A L R T G W Y T S V I T I  
 E L S N I K E N K C N G T D A K V K L I K Q E L D K Y K N A V T E L Q L L M Q S T P A T N N R A R R E L P R F M N Y T L N N A K  
 K T N V T L S K R K R R R F L G F L L G V G S A I A S G V A V S K V L H L E G E V N K I K S A L L S T N K A V V S L S N G V S V  
 L T S K V L D L K N Y I D K Q L L P I V N K Q S C S I S N I E T V I E F Q Q K N N R L L E I T R E F S V N A G V T T P V S T Y M  
 L T N S E L L S L I N D M P I T N D Q K K L M S N N V Q I V R Q Q S Y S I M S I I K E E V L A Y V V Q L P L Y G V I D T P C W K  
 L H T S P L C T T N T K E G S N I C L T R T D R G W Y C D N A G S V S F F P Q A E T C K V Q S N R V F C D T M N S L T L P S E V  
 N L C N V D I F N P K Y D C R I M T L K T D V S S S V I T S L G A I V S C Y G K T K T A S N K N R G I I K T F S N G C D Y V S  
 N K G V D T V S V G N T L Y Y V N K Q E G K S L Y V K G E P I I N F Y D P L V F P S D E F D A S I S Q V N E K I N Q S L A F I R  
 K S D E L L H N V N A V K S T T N I M I T T I I I V I I V I L L S L I A V G L L L Y C K A R S T P V T L S K D Q L S G I N N I A  
 F S N

**Растворимый предшественник F, A2 RSV, (SEQ ID NO: 24) D486N**

MELLILKANAI T T I L T A V T F C F A S G Q N I T E E F Y Q S T C S A V S K G Y L S A L R T G W Y T S V I T I  
 E L S N I K E N K C N G T D A K V K L I K Q E L D K Y K N A V T E L Q L L M Q S T P A T N N R A R R E L P R F M N Y T L N N A K  
 K T N V T L S K R K R R R F L G F L L G V G S A I A S G V A V S K V L H L E G E V N K I K S A L L S T N K A V V S L S N G V S V  
 L T S K V L D L K N Y I D K Q L L P I V N K Q S C S I S N I E T V I E F Q Q K N N R L L E I T R E F S V N A G V T T P V S T Y M  
 L T N S E L L S L I N D M P I T N D Q K K L M S N N V Q I V R Q Q S Y S I M S I I K E E V L A Y V V Q L P L Y G V I D T P C W K  
 L H T S P L C T T N T K E G S N I C L T R T D R G W Y C D N A G S V S F F P Q A E T C K V Q S N R V F C D T M N S L T L P S E V  
 N L C N V D I F N P K Y D C K I M T S K T D V S S S V I T S L G A I V S C Y G K T K T A S N K N R G I I K T F S N G C D Y V S  
 N K G V D T V S V G N T L Y Y V N K Q E G K S L Y V K G E P I I N F Y D P L V F P S N E F D A S I S Q V N E K I N Q S L A F I R  
 K S D E L L

<sup>SAIG</sup>GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

**Растворимый предшественник F, A2 RSV, (SEQ ID NO: 25) D489Y**

MELLILKANAI T T I L T A V T F C F A S G Q N I T E E F Y Q S T C S A V S K G Y L S A L R T G W Y T S V I T I  
 E L S N I K E N K C N G T D A K V K L I K Q E L D K Y K N A V T E L Q L L M Q S T P A T N N R A R R E L P R F M N Y T L N N A K  
 K T N V T L S K R K R R R F L G F L L G V G S A I A S G V A V S K V L H L E G E V N K I K S A L L S T N K A V V S L S N G V S V

LTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYM  
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK  
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMMNSLTLPSEV  
 NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFNSNGCDYVS  
 NKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFYASISQVNEKINQSLAFIR  
 KSDELL

SAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

**Растворимый предшественник F, A2 RSV, (SEQ ID NO: 26)  
 S398L, K394R**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE  
 ELSNIKENKCNNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK  
 KTNVTLSSKKRRRFLGFLLVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVVKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSV  
 LTSKVDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYM  
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK  
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMMNSLTLPSEV  
 NLCNVDIFNPKYDCRIMTLKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFNSNGCDYVS  
 NKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIR  
 KSDELL

SAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для индукции иммунного ответа на F-белок RSV, содержащая рекомбинантный полипептид слияния (F) респираторно-синцитиального вируса (RSV), который является стабильным в конформации до слияния, где указанный F-полипептид RSV содержит по меньшей мере одну мутацию по сравнению с F-полипептидом RSV дикого типа, при этом по меньшей мере одна мутация выбрана из группы, состоящей из а) мутации аминокислоты аспарагиновой кислоты (D) в положении 486 в аспарагин (N), б) мутации аминокислоты аспарагиновой кислоты (D) в положении 489 в тирозин (Y) и с) мутации аминокислоты серина (S) в положении 398 в лейцин (L) и/или аминокислоты лизина (K) в положении 394 в аргинин (R).

2. Композиция для индукции иммунного ответа на F-белок RSV, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный полипептид слияния (F) респираторно-синцитиального вируса (RSV), который является стабилизированным в конформации до слияния, где указанный F-полипептид RSV содержит по меньшей мере одну мутацию по сравнению с F-полипептидом RSV дикого типа, при этом по меньшей мере одна мутация выбрана из группы, состоящей из а) мутации аминокислоты аспарагиновой кислоты (D) в положении 486 в аспарагин (N), б) мутации аминокислоты аспарагиновой кислоты (D) в положении 489 в тирозин (Y) и с) мутации аминокислоты серина (S) в положении 398 в лейцин (L) и/или аминокислоты лизина (K) в положении 394 в аргинин (R).

3. Композиция по п.2, где последовательность нуклеиновой кислоты содержится в векторе.

4. Композиция по любому из пп.1-3, где F-полипептид RSV представляет собой полноразмерный белок RSV.

5. Композиция по любому из пп.1-3, где F-полипептид RSV представляет собой растворимый F-белок RSV.

6. Композиция по любому из пп.1-5, где полипептид является стабильным в течение по меньшей мере 10 мин при 55°C, предпочтительно при 58°C, более предпочтительно при 60°C.

7. Композиция по любому из пп.1-6, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21-26.

8. Применение композиции по любому из пп.1-7 для индукции иммунного ответа на F-белок RSV.

9. Применение композиции по любому из пп.1-8 в качестве вакцины.

10. Применение композиции по любому из пп.1-9 для профилактики и/или лечения инфекции, вызванной RSV.

