

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 039124

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.12.08

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

(21) Номер заявки
201892702

(22) Дата подачи заявки
2017.05.29

(54) СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ F-БЕЛКИ RSV ДО СЛИЯНИЯ

(31) 16172008.1

(56) WO-A1-2014174018
WO-A1-2015013551

(32) 2016.05.30

(33) EP

(43) 2019.05.31

(86) PCT/EP2017/062875

(87) WO 2017/207480 2017.12.07

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

(72) Изобретатель:
Лангедейк Йоханнес Петрус Мария
(NL)

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

(57) Настоящее изобретение предусматривает стабильные F-белки респираторно-синцитиального вируса (RSV) до слияния, иммуногенные композиции, содержащие указанные белки, и пути их применения для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной RSV.

039124 B1

039124 B1

039124

B1

Настоящее изобретение относится к области медицины. Настоящее изобретение относится, в частности, к рекомбинантным F-белкам RSV до слияния, к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим F-белки RSV, и путям их применения, например в вакцинах.

Предпосылки изобретения

После открытия респираторно-синцициального вируса (RSV) в 1950-х этот вирус быстро стал признанным патогеном, ассоциированным с инфекциями верхних и нижних дыхательных путей у людей. По оценкам в мире ежегодно наблюдается 64 млн случаев инфекции RSV, которые приводят к 160000 смертельным исходам (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 возрастом менее 2 лет RSV является наиболее распространенным патогеном дыхательных путей, на долю которого приходится приблизительно 50% случаев госпитализации вследствие респираторных инфекций, и пик госпитализации наблюдается в возрасте 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 пожилых людей бремя заболевания, вызванного RSV, является сходным с таковыми, которые вызваны инфекциями, возбудителем которых является непандемический вирус 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.

F-белок RSV обеспечивает слияние мембран вируса и клетки-хозяина путем необратимого рефолдинга белка из лабильной конформации до слияния в стабильную конформацию после слияния. Структуры обеих конформаций были определены для F-белка 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, что обеспечивает возможность более глубокого изучения механизма этого сложного процесса слияния. Подобно другим белкам слияния типа I, для неактивного предшественника, F₀ RSV, требуется расщепление с помощью фуриноподобной протеазы в ходе внутриклеточного созревания. F-белок RSV содержит два сайта для фурина, расщепление по которым приводит к образованию трех белков: F2, р27 и F1, причем последний на своем N-конце содержит гидрофобный пептид слияния (FP). Для рефолдинга из конформации до слияния в конформацию после слияния участок рефолдинга 1 (RR1), находящийся между остатками 137 и 216, который включает FP и гептадный повтор А (HRA), подлежит трансформации из сборки в виде спиралей, петель и нитей в длинную непрерывную спираль. FP, расположенный на N-концевом сегменте RR1, в дальнейшем способен вытягиваться от вирусной мембраны и встраиваться в проксимальный участок мембраны целевой клетки. Затем участок рефолдинга 2 (RR2), который формирует C-концевую петлю в шиповидном отростке F-белка до слияния и включает гептадный повтор В (HRB), перемещается на другую сторону головки F-белка RSV и связывает суперспиральный тример HRA с доменом HRB с образованием пучка из шести спиралей. Образование суперспиральной структуры RR1 и перемещение RR2 с формированием пучка из шести спиралей представляют собой наиболее важные структурные изменения, которые происходят в ходе процесса рефолдинга.

В настоящее время вакцина против инфекции, вызванной RSV, отсутствует, но является необходимой из-за высокого бремени заболевания. Гликопротеин слияния RSV (F-белок RSV) представляет собой перспективный антиген для получения вакцины, поскольку он является главной мишенью для нейтрализующих антител в сыворотке крови человека. Большинство нейтрализующих антител в сыворотке крови человека направлены против конформации до слияния, однако из-за ее нестабильности конформация до слияния характеризуется склонностью к преждевременному рефолдингу в конформацию после слияния как в жидкой среде, так и на поверхности вирионов. Как указывалось выше, с помощью кристаллических структур обнаружили значительное конформационное изменение между состояниями до слияния 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 до слияния на поверхности вируса. Соответственно, усилия для получения вакцины против RSV сосредоточивались на разработке вакцин, которые содержат формы F-белка RSV до слияния (см., например, WO 2010/1149745, WO 2010/1149743, WO 2009/1079796, WO 2012/158613). Однако эти усилия не позволили получить стабильных F-белков RSV до слияния, которые можно было бы использовать в качестве кандидатов для тестирования у людей.

Следовательно, сохраняется потребность в эффективных вакцинах против RSV, в частности в вакцинах, содержащих F-белки RSV в конформации до слияния. Целью настоящего изобретения является получение таких стабильных F-белков RSV до слияния для применения в вакцинации против RSV безопасным и эффективным способом.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение предусматривает стабильные рекомбинантные белки слияния (F) респираторно-синцитиального вируса (RSV) до слияния, т.е. рекомбинантные F-белки RSV, которые являются стабилизированными в конформации до слияния, и их фрагменты. F-белки RSV или их фрагменты содержат по меньшей мере один эпитоп, который является специфическим для конформации F-белка до слияния. В определенных вариантах осуществления F-белки RSV до слияния представляют собой растворимые белки. В определенных вариантах осуществления F-белки RSV представляют собой тримеры. В определенных вариантах осуществления F-белки RSV представляют собой мультимеры тримерных F-белков RSV. Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие F-белки RSV до слияния или их фрагменты, а также векторы, содержащие такие молекулы нуклеиновой кислоты.

Настоящее изобретение также относится к композициям, предпочтительно иммуногенным композициям, содержащим F-белок RSV, молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор, а также к их применению в индуцировании иммунного ответа на F-белок RSV, в частности их применению в качестве вакцин. Настоящее изобретение также относится к способам индуцирования у субъекта иммунного ответа на респираторный синцитиальный вирус (RSV), предусматривающим введение субъекту эффективного количества F-белка RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный F-белок RSV, и/или вектора, содержащего указанную молекулу нуклеиновой кислоты. Предпочтительно индуцированный иммунный ответ характеризуется выработкой нейтрализующих антител к RSV и/или защитным иммунитетом против RSV. В конкретных аспектах настоящее изобретение относится к способу индуцирования у субъекта выработки антител к F-белку респираторного синцитиального вируса (RSV), предусматривающему введение субъекту эффективного количества иммуногенной композиции, содержащей F-белок RSV до слияния, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный F-белок RSV, и/или вектор, содержащий указанную молекулу нуклеиновой кислоты.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Очистка F-белка с мутациями N67I, S215P, T357K, N371Y и D486N. Хроматограмма элюата из ионообменной колонки, полученная в результате гель-фильтрации с использованием колонки Superdex200. Стрелка указывает на пик, соответствующий собранному материалу.

Фиг. 2. А) Результат SDS-PAGE-анализа в восстанавливающих (R) и невосстанавливающих (NR) условиях для пика SEC-хроматограммы, содержащего образец F-белка N67I, S215P, T357K, N371Y, D486N. Гели окрашены кумасси бриллиантовым синим.

Фиг. 3. Белковую концентрацию очищенного F-белка RSV F N67I, S215P, T357K, N371Y, D486N измеряли путем анализа на базе системы Q Octet с помощью моноклональных антител CR9501 и CR9503. CR9501 связывается только с F-белком RSV в конформации до слияния. CR9503 связывается с F-белком RSV как в конформации до слияния, так и в конформации после слияния. Данные на графике представлены в виде средних значений $\pm$ SE.

Фиг. 4. Термостабильность F-белка RSV F N67I, S215P, T357K, N371Y, D486N. Температура плавления (T_m , °C), определенная с помощью анализа посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) с применением флуоресцентного красителя SyproOrange. Введение замен T357K и N371Y повышало T_m PRPM на значение от 3,5 до 68,5°.

Подробное описание изобретения

Белок слияния (F) респираторного синцитиального вируса (RSV) участвует в слиянии мембраны вируса с мембраной клетки-хозяина, которое требуется для инфицирования. мРНК F-белка RSV транслируется в белок-предшественник из 574 аминокислот, обозначаемый F0, который содержит последовательность сигнального пептида на N-конце (например, аминокислотные остатки 1-26 из SEQ ID NO: 13), которая удаляется сигнальной пептидазой в эндоплазматическом ретикулуме. F0 расщепляется клеточными протеазами (в частности, фурином или фуриноподобной протеазой) по двум сайтам (между аминокислотными остатками 109/110 и 136/137) с удалением короткой гликозилированной последовательности, расположенной посередине (также называемой участком p27, содержащим аминокислотные остатки 110-136) и образованием двух доменов или субъединиц, обозначаемых F1 и F2. Домен F1 (аминокислотные остатки 137-574) содержит гидрофобный пептид слияния на своем N-конце, и C-конец содержит трансмембранный (TM) (аминокислотные остатки 530-550) и цитоплазматический участок (аминокислотные остатки 551-574). Домен F2 (аминокислотные остатки 27-109) ковалентно связан с F1 двумя дисульфидными мостиками. Гетеродимеры F1-F2 подвергаются сборке в вирионе в виде гомотримеров.

Вакцина против инфекции, вызванной RSV, в настоящее время еще отсутствует. Одним потенциальным подходом к получению вакцины является получение субъединичной вакцины на основе очищенного F-белка RSV. Однако для данного подхода требуется, чтобы очищенный F-белок RSV находился в конформации, которая подобна конформации F-белка RSV в состоянии до слияния, которая стабильна с течением времени и может быть получена в достаточных количествах. Кроме того, для вакцины на основе растворимой субъединицы необходимо осуществить усечение F-белка RSV путем делеции трансмембранного (TM) и цитоплазматического участка с получением растворимого секретиремого F-белка (sF). Поскольку TM-участок отвечает за заякоривание в мембране и стабильность, неспособный к заякорива-

нию растворимый F-белок является в значительной степени более лабильным, чем полноразмерный белок, и будет с легкостью подвергаться рефолдингу в конечное состояние после слияния. Для получения растворимого F-белка в стабильной конформации до слияния, который характеризуется высокими уровнями экспрессии и высокой стабильностью, необходимо, таким образом, стабилизировать конформацию до слияния. Поскольку полноразмерный (мембраносвязанный) F-белок RSV также является метастабильным, для полноразмерного F-белка RSV также необходима стабилизация конформации до слияния, например в случае любого подхода по созданию живых аттенуированных вакцин или векторных вакцин.

Для стабилизации растворимого F-белка RSV, который в конформации до слияния расщепляется на субъединицы F1 и F2, производили слияние фибритинового домена тримеризации с C-концом растворимого F-белка RSV (McLellan et al., *Nature Struct. Biol.* 17: 2-248-250 (2010); McLellan et al., *Science* 340(6136):1113-7 (2013)). Этот домен фибритина или "фолдон" получают из T4-фибритина и ранее он был описан как природный домен тримеризации (Letarov et al., *Biochemistry Moscow* 64: 817-823 (1993); S-Guthe et al., *J. Mol. Biol.* 337: 905-915. (2004)). Однако применение домена тримеризации не позволяет получить стабильный F-белок RSV до слияния (Kragup et al., *Nature Comm.* 6:8143, (2015)). Более того, эти усилия даже не позволили получить кандидатов, пригодных для тестирования у людей.

Недавно авторами настоящего изобретения были описаны комбинации из нескольких мутаций, которые способны стабилизировать конформацию F-белка RSV до слияния (WO 2014/174018 и WO 2014/202570). Таким образом, были описаны стабильные F-белки RSV до слияния, содержащие мутацию аминокислотного остатка в положении 67 и/или мутацию аминокислотного остатка в положении 215, предпочтительно мутацию по типу замены аминокислотного остатка N/T в положении 67 на I и/или мутацию по типу замены аминокислотного остатка S в положении 215 на P. Кроме того, были описаны растворимые F-белки RSV до слияния, содержащие усеченный домен F1 и содержащие мутацию аминокислотного остатка в положении 67 и/или мутацию аминокислотного остатка в положении 215, предпочтительно мутацию по типу замены аминокислотного остатка N/T в положении 67 на I и/или мутацию по типу замены аминокислотного остатка S в положении 215 на P, при этом белок содержит гетерологичный домен тримеризации, связанный с указанным усеченным доменом F1. Были описаны дополнительные F-белки RSV до слияния, где белки содержат по меньшей мере одну дополнительную мутацию, такую как мутация по типу замены аминокислотного остатка D в положении 486 на N.

В соответствии с настоящим изобретением было обнаружено, что введение двух других мутаций, т.е. в положениях 357 и 371 (нумерация согласно SEQ ID NO: 13), также стабилизирует белок в конформации до слияния.

Настоящее изобретение, таким образом, предусматривает рекомбинантные F-белки до слияния, содержащие мутацию аминокислотного остатка в положении 215, в частности мутацию по типу замены аминокислоты S в положении 215 на P (S215P), в комбинации с мутацией аминокислот в положении 357, в частности мутацией по типу замены аминокислоты T в положении 357 на K (T357K), и мутацией аминокислоты в положении 371, в частности мутацией по типу замены аминокислоты N в положении 371 на Y (N371Y).

Настоящее изобретение, таким образом, предусматривает уникальную комбинацию мутаций для обеспечения рекомбинантных стабильных F-белков RSV до слияния, т.е. F-белков RSV, которые являются стабилизированными в конформации до слияния, или их фрагментов. Стабильные F-белки RSV до слияния по настоящему изобретению или их фрагменты находятся в конформации до слияния, т.е. они содержат (имеют) по меньшей мере один эпитоп, который является специфическим для конформации F-белка до слияния. Эпитоп, который является специфическим для конформации F-белка до слияния, представляет собой эпитоп, который не представлен в конформации после слияния. Не ограничиваясь конкретной теорией, полагают, что конформация F-белка RSV до слияния может содержать эпитопы, которые являются такими же, как эпитопы на F-белке RSV, экспрессируемые на встречающихся в природе вирионах RSV, и, следовательно, может предоставлять преимущества для активизации защитных нейтрализующих антител.

В определенных вариантах осуществления F-белки RSV до слияния по настоящему изобретению или их фрагменты содержат по меньшей мере один эпитоп, который распознается моноклональным антителом, специфичным к конформации до слияния, содержащим CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 2, CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 3 и CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 4, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 5 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 6 (далее в этом документе упоминаемый как CR9501), и/или моноклональным антителом, специфичным к конформации до слияния, содержащим CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 8, CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 9 и CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 10, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 11 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 12 (упоминаемый как CR9502). CR9501 и CR9502 содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей и, таким образом, обладают связывающими специфичностями антител 58C5 и 30D8 соответственно, которые, как было показано ранее, специфично связываются с F-белком RSV в его конформации до слияния, но не в конформации после слияния (см. WO 2012/006596).

В определенных вариантах осуществления рекомбинантные F-белки RSV до слияния являются

тримерными.

Как используется по всей настоящей заявке, нуклеотидные последовательности представлены в направлении от 5'- к 3'-концу, а аминокислотные последовательности от N-конца к С-концу, как принято в данной области.

Как указано выше, настоящим изобретением также охватываются фрагменты F-белка RSV до слияния. Фрагмент может представлять собой результат какой-либо одной или обеих из аминоконцевой (например, осуществляемой путем отщепления сигнальной последовательности) и карбоксиконцевой делеций (например, осуществляемой путем удаления трансмембранного участка и/или цитоплазматического хвоста). Может быть выбран такой фрагмент, который включает иммунологически активный фрагмент F-белка, т.е. часть, которая будет приводить к иммунному ответу у субъекта. Его можно легко определить с применением способов *in silico*, *in vitro* и/или *in vivo*, все из которых хорошо известны специалистам в данной области.

В определенных вариантах осуществления кодируемые белки или фрагменты в соответствии с настоящим изобретением содержат сигнальную последовательность, также называемую лидерной последовательностью или сигнальным пептидом, соответствующую аминокислотам 1-26 из SEQ ID NO: 13. Сигнальные последовательности обычно являются короткими (например, 5-30 аминокислот в длину) аминокислотными последовательностями, присутствующими на N-конце большинства вновь синтезированных белков, которые направляются по секреторному пути и обычно отщепляются сигнальной пептидазой с образованием свободного сигнального пептида и зрелого белка.

В определенных вариантах осуществления белки или их фрагменты в соответствии с настоящим изобретением не содержат сигнальной последовательности.

В определенных вариантах осуществления F-белки RSV до слияния (или их фрагменты) являются растворимыми. В определенных вариантах осуществления стабильные F-белки RSV до слияния или их фрагменты в соответствии с настоящим изобретением содержат усеченный домен F1 и содержат гетерологичный домен тримеризации, связанный с указанным усеченным доменом F1. В соответствии с настоящим изобретением было показано, что путем связывания гетерологичного домена тримеризации с С-концевым аминокислотным остатком усеченного домена F1, объединенного со стабилизирующей (стабилизирующими) мутацией (мутациями), получают растворимые F-белки RSV, которые характеризуются высокой экспрессией и которые связываются с антителами, специфичными к конформации до слияния, что указывает на то, что белки находятся в конформации до слияния. Кроме того, F-белки RSV стабилизированы в конформации до слияния, т.е. даже после обработки белков они по-прежнему связываются с антителами CR9501 и/или CR9502, специфичными к конформации до слияния, что указывает на то, что сохраняется эпитоп, специфичный к конформации до слияния.

В определенных вариантах осуществления F-белки RSV представляют собой мультимеры тримерных F-белков RSV. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления F-белки RSV могут содержать домен сборки для сборок тримеров более высокого порядка.

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

В определенных вариантах осуществления штамм RSV представляет собой штамм RSV с SEQ ID NO: 20.

В определенных вариантах осуществления штамм RSV представляет собой штамм В RSV. В определенных вариантах осуществления штамм RSV представляет собой штамм В RSV с SEQ ID NO: 15.

Аминокислота в соответствии с настоящим изобретением может быть любой из двадцати встречающихся в природе (или "стандартных" аминокислот) или их вариантов, таких как, например, D-аминокислоты (D-энантиомеры аминокислот с хиральным центром), или любыми вариантами, которые не встречаются в природе в белках, 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, как, например, цистеин, который может образовывать ковалентные дисульфидные связи (или дисульфидные мостики) с другими цистеиновыми остатками, пролин, который индуцирует повороты бел-

кового остова, и глицин, который является более гибким, чем другие аминокислоты. В табл. 1 приведены сокращения и свойства стандартных аминокислот.

Специалисту в данной области будет понятно, что вносить мутации в белок можно с помощью стандартных методик молекулярной биологии. Результатом мутаций в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно являются повышенные уровни экспрессии и/или повышенная стабилизация F-белков RSV до слияния по сравнению с F-белками RSV, которые не содержат данную (данные) мутацию (мутации).

В определенных вариантах осуществления F-белки RSV до слияния или их фрагменты содержат по меньшей мере одну дополнительную мутацию, выбранную из группы, состоящей из

- (a) мутации аминокислотного остатка в положении 67 и
- (b) мутации аминокислотного остатка в положении 486.

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

- (a) мутации по типу замены аминокислотного остатка N/T в положении 67 на I и
- (b) мутации по типу замены аминокислотного остатка D в положении 486 на N.

В определенных вариантах осуществления F-белки RSV до слияния или их фрагменты содержат по меньшей мере четыре мутации (по сравнению с F-белком RSV дикого типа, например содержащим аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13). В определенных вариантах осуществления белки или их фрагменты содержат по меньшей мере пять мутаций.

В определенных вариантах осуществления белки или их фрагменты содержат по меньшей мере шесть мутаций.

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

- (a) мутации аминокислотного остатка в положении 46;
- (b) мутации аминокислотного остатка в положении 83;
- (c) мутации аминокислотного остатка в положении 92;
- (d) мутации аминокислотного остатка в положении 184;
- (e) мутации аминокислотного остатка в положении 203;
- (f) мутации аминокислотного остатка в положении 207;
- (g) мутации аминокислотного остатка в положении 487.

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

- (a) мутации по типу замены аминокислотного остатка S в положении 46 на G;
- (b) мутации по типу замены аминокислотного остатка L в положении 83 на M;
- (c) мутации по типу замены аминокислотного остатка E в положении 92 на D;
- (d) мутации по типу замены аминокислотного остатка G в положении 184 на N;
- (e) мутации по типу замены аминокислотного остатка L в положении 203 на I;
- (f) мутации по типу замены аминокислотного остатка V в положении 207 на I;
- (g) мутации по типу замены аминокислотного остатка E в положении 487 на Q, N или I.

В определенных вариантах осуществления гетерологичный домен тримеризации содержит аминокислотную последовательность GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL (SEQ ID NO: 14).

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

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

В определенных вариантах осуществления F-белок RSV по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 21.

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

F-белки RSV до слияния в соответствии с настоящим изобретением являются стабильными, т.е. для них не характерен быстрый переход в конформацию после слияния при обработке белков, как, например, при очистке, циклах замораживания-оттаивания и/или хранения и т.д.

В определенных вариантах осуществления F-белки RSV до слияния в соответствии с настоящим изобретением характеризуются повышенной стабильностью при хранении при 4°C по сравнению с F-белком RSV без мутации (мутаций). В определенных вариантах осуществления белки являются стабиль-

ными 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 белки по-прежнему имеют по меньшей мере один эпитоп, специфичный в отношении антител, специфичных к конформации до слияния (например, CR9501), при хранении белка в растворе (например, среде для культивирования) при 4°C в течение по меньшей мере 30 дней. В определенных вариантах осуществления белки имеют по меньшей мере один эпитоп, специфический для конформации до слияния, в течение по меньшей мере 6 месяцев, предпочтительно в течение по меньшей мере 1 года, при хранении F-белков RSV до слияния при 4°C.

В определенных вариантах осуществления F-белки RSV до слияния в соответствии с настоящим изобретением характеризуются повышенной стабильностью при воздействии теплом по сравнению с F-белками RSV без указанной (указанных) мутации (мутаций). В определенных вариантах осуществления F-белки RSV до слияния являются термостабильными в течение по меньшей мере 30 мин при температуре 55°C, предпочтительно при 58°C, более предпочтительно при 60°C. "Термостабильный" означает, что белки по-прежнему имеют по меньшей мере один эпитоп, специфический для конформации до слияния, после того, как их подвергали воздействию повышенной температуры (т.е. температуры, составляющей 55°C или выше) в течение по меньшей мере 30 мин, например, как определяют с помощью способа, описанного в примерах (см. фиг. 4).

В определенных вариантах осуществления белки имеют по меньшей мере один эпитоп, специфический для конформации до слияния, после проведения от 1 до 6 циклов замораживания-оттаивания в соответствующем буферном составе.

Как используется по всей настоящей заявке, нуклеотидные последовательности представлены в направлении от 5'- к 3'-концу, а аминокислотные последовательности от N-конца к С-концу, как принято в данной области.

В определенных вариантах осуществления кодируемые белки в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержат лидерную последовательность, также называемую сигнальной последовательностью или сигнальным пептидом, соответствующую аминокислотам 1-26 из SEQ ID NO: 13. Она представляет собой короткий (обычно 5-30 аминокислот в длину) пептид, присутствующий на N-конце большинства вновь синтезированных белков, которые направляются по секреторному пути. В определенных вариантах осуществления белки в соответствии с настоящим изобретением не содержат лидерную последовательность.

В определенных вариантах осуществления белки содержат HIS-метку. His-метка или полигистидиновая метка представляет собой аминокислотный мотив в белках, который состоит по меньшей мере из пяти остатков гистидина (H), зачастую на N- или С-конце белка, который, как правило, используют для целей очистки.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие F-белки RSV в соответствии с настоящим изобретением.

В предпочтительных вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие белки в соответствии с настоящим изобретением, являются оптимизированными по кодонам для экспрессии в клетках млекопитающего, предпочтительно клетках человека. Способы оптимизации по кодонам известны и 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, а 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 сайте <http://www.kazusa.or.jp/codon>. Предпочтительно более одного кодона, не являющегося предпочтительным, предпочтительно большинство или все кодоны, не являющиеся предпочтительными, замещают кодонами, которые являются более предпочтительными. Предпочтительно в оптимизированной по кодонам последовательности используют кодоны, наиболее часто используемые в организме. Как правило, замещение предпочтительными кодонами приводит к более высокой экспрессии.

Специалисту в данной области будет понятно, что в результате вырожденности генетического кода несколько различных полинуклеотидов и молекул нуклеиновой кислоты могут кодировать один и тот же белок. Также понятно, что специалисты в данной области с помощью стандартных методик могут осуществлять нуклеотидные замены, которые не влияют на последовательность белка, кодируемую молекулами нуклеиновой кислоты, для достижения соответствия использованию кодонов в любом конкретном организме-хозяине, в котором будут экспрессироваться эти белки. Следовательно, если 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 включать интроны или могут не включать их.

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

Настоящее изобретение также предусматривает векторы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, описанную выше. Таким образом, в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением является частью вектора. С такими векторами можно легко производить манипуляции с помощью способов, хорошо известных специалисту в данной области, и их, например, 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. Применяемый вектор может представлять собой любой вектор, который подходит для клонирования ДНК и который можно применять для обеспечения транскрипции нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. Подходящими векторами в соответствии с настоящим изобретением являются, например, аденовекторы, векторы на основе альфавируса, парамиксовируса, вируса осповакцины, вируса герпеса, ретровирусные векторы и т.д. Специалист в данной области может выбрать подходящие векторы экспрессии и вставить последовательности нуклеиновых кислот по настоящему изобретению функциональным образом.

Клетки-хозяева, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие F-белки RSV до слияния, также образуют часть настоящего изобретения. F-белки RSV до слияния можно получать посредством технологии рекомбинантной ДНК, включающей обеспечение экспрессии молекул в клетках-хозяевах, например клетках яичника китайского хомячка (CHO), линиях опухолевых клеток, клетках ВНК, линиях клеток человека, таких как клетки HEK293, клетки PER.C6, или клетках дрожжей, грибов, насекомых и т.п., или в трансгенных животных или растениях. В определенных вариантах осуществления клетки происходят из многоклеточного организма, в определенных вариантах осуществления они происходят из позвоночных или беспозвоночных. В определенных вариантах осуществления клетки представляют собой клетки млекопитающего. В определенных вариантах осуществления клетки представляют собой клетки человека. В целом получение рекомбинантных белков, таких как F-белки RSV до слияния по настоящему изобретению, в клетке-хозяине предусматривает введение гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок в экспрессируемом формате, в клетку-хозяина, культивирование клеток в условиях, способствующих экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, и обеспечение экспрессии белка в указанной клетке. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок в экспрессируемом формате, может находиться в форме кассеты экспрессии и для нее обычно требуются последовательности, способствующие экспрессии нуклеиновой кислоты, такие как энхансер (энхансеры), промотор, сигнал полиаденилирования и т.п. Специалист в данной области осведомлен о том, что для достижения экспрессии гена в клетках-хозяевах можно использовать различные промоторы. Промоторы могут быть конститутивными или регулируемыми, и их можно получить из разных источников, в том числе вирусов, прокариотических или эукариотических источников, или конструировать искусственным способом.

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

"Гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты" (также называемая в данном документе "трансгеном") представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая в природе не присутствует в клетке-хозяине. Ее вводят, например, в вектор с помощью стандартных методик молекулярной биологии. Трансген, как правило, функционально связывают с последовательностями, контролирующими экспрессию. Это можно выполнять, например, путем помещения нуклеиновой кислоты, кодирующей трансген (трансгены), под контроль промотора. Можно добавлять дополнительные регуляторные последовательности. Для экспрессии трансгена (трансгенов) можно использовать многие промоторы, и они известны специалисту в данной области, например, они могут включать промоторы вируса, млекопитающего, синтетические промоторы и т.п. Неограничивающим примером подходящего промотора для обеспечения экспрессии в эукариотических клетках является промотор CMV (US 5385839), например предранний промотор CMV, например содержащий нукл. от -735 до +95 из энхансера/промотора предраннего гена CMV. Сигнал полиаденилирования, например сигнал полиА гена бычьего гормона роста (US 5122458), может располагаться позади трансгена (трансгенов). В качестве альтернативы несколько широко используемых векторов экспрессии можно получить на основании знаний из уровня техники и из коммерческих источников, например серии векторов pcDNA и pEF от Invitrogen, pMSCV и pTK-Hyg от BD Sciences, pCMV-Script от Stratagene и т.д., которые можно применять 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 сосуда для культивирования или к микроносителям, а также суспензионную культуру. Для крупномасштабного культивирования большинства суспензионных культур применяют периодический процесс или периодический процесс с подпиткой, поскольку они являются наиболее простыми для управления и увеличения масштаба. В настоящее время непрерывные процессы, основанные на принципах перфузии, становятся более распространенными, и они также являются подходящими. Подходящие среды для культивирования также хорошо известны специалисту в данной области и могут, как правило, быть получены из коммерческих источников в больших количествах или изготовлены по заказу в соответствии со стандартными протоколами. 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 предусматривает композиции, содержащие F-белок RSV до слияния, и/или молекулу нуклеиновой кислоты, и/или вектор, которые описаны выше. Таким образом, настоящее изобретение предусматривает композиции, содержащие F-белок RSV до слияния, который имеет эпитоп, который присутствует в конформации F-белка RSV до слияния, но отсутствует в конформации после слияния. Настоящее изобретение также предусматривает композиции, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор, кодирующие такой F-белок RSV до слияния. Настоящее изобретение дополнительно предусматривает иммуногенные композиции, содержащие F-белок RSV до слияния, и/или молекулу нуклеиновой кислоты, и/или вектор, которые описаны выше. Настоящее изобретение также предусматривает применение стабилизированного F-белка RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектора в соответствии с настоящим изобретением для индуцирования иммунного ответа на F-белок RSV у субъекта. Дополнительно предусмотрены способы индуцирования у субъекта иммунного ответа на F-белок RSV, предусматривающие введение субъекту F-белка RSV до слияния, и/или молекулы нуклеиновой кислоты, и/или вектора в соответствии с настоящим изобретением. Также предусмотрены F-белки RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты и/или векторы в соответствии с настоящим изобретением для индуцирования иммунного ответа у субъекта на F-белок RSV. Дополнительно предусмотрено применение F-белков RSV до слияния, и/или молекул нуклеиновой кислоты, и/или векторов в соответствии с настоящим изобретением для изготовления лекарственного препарата для применения в индуцировании у субъекта иммунного ответа на F-белок RSV.

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

F-белки RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты и/или векторы в соответствии с настоящим изобретением можно применять, например, в отдельности для лечения и/или профилактики заболевания или состояния, вызываемого RSV, или в комбинации с другими профилактическими и/или терапевтическими средствами лечения, такими как (существующие или разработанные в будущем) вакцины, противовирусные средства и/или моноклональные антитела.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способы предупреждения и/или лечения у субъекта инфекции, вызванной RSV, с использованием F-белков RSV до слияния, молекул нуклеиновой кислоты и/или векторов в соответствии с настоящим изобретением. В конкретном варианте осуществления способ предупреждения и/или лечения у субъекта инфекции, вызванной RSV, предусматривает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества F-белка RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектора, которые описаны выше. Терапевтически эффективное количество относится к количеству белка, молекулы нуклеиновой кислоты или вектора, которое является эффективным для предупреждения, облегчения 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, ассоциированных с инфекцией, вызванной RSV. Облегчение, как используется в данном документе, может относиться к уменьшению видимых или ощутимых симптомов заболевания, вирусемии или других поддающихся измерению проявлений инфекции гриппа.

Для введения субъектам, таким как люди, в настоящем изобретении могут применяться фармацевтические композиции, содержащие F-белок RSV до слияния, молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор, которые описаны в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В контексте настоящего изобретения термин "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель или

наполнитель в используемых дозировках и концентрациях не будет вызывать каких-либо нежелательных или неблагоприятных 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]; и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). F-белки RSV или молекулы нуклеиновой кислоты предпочтительно составляют и вводят в виде стерильного раствора, хотя также возможно использование лиофилизированных препаратов. Стерильные растворы получают с помощью стерилизующей фильтрации или с помощью других способов, известных per se из уровня техники. Затем растворы лиофилизируют или заполняют ими контейнеры, предназначенные для лекарственных форм. Значение pH раствора, как правило, находится в диапазоне pH 3,0-9,5, например, pH 5,0-7,5. F-белки RSV обычно находятся в растворе, содержащем подходящий фармацевтически приемлемый буфер, и композиция также может содержать соль. Необязательно может присутствовать стабилизирующее средство, такое как альбумин. В определенных вариантах осуществления добавляют детергент. В определенных вариантах осуществления F-белки RSV могут быть составлены в виде инъекционного препарата.

В некоторых вариантах осуществления композиция в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержит один или несколько адъювантов. Адъюванты, как известно из уровня техники, дополнительно повышают иммунный ответ в отношении применяемой антигенной детерминанты. Термины "адъювант" и "иммуностимулятор" используются 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 на F-белки RSV по настоящему изобретению. Примеры подходящих адъювантов включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия; композиции в виде 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); вещества, происходящие из 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 т.д.), которые стимулируют иммунный ответ при взаимодействии с рецепиентными клетками. В определенных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат в качестве адъюванта алюминий, например в форме гидроксида алюминия, фосфата алюминия, фосфата алюминия-калия или их комбинации, в концентрациях 0,05-5 мг, например, 0,075-1,0 мг алюминия на дозу.

F-белки RSV до слияния можно также вводить в комбинации с наночастицами или в виде конъюгированных с наночастицами, такими как, например, полимеры, липосомы, виросомы, вирусоподобные частицы. F-белки до слияния могут быть комбинированы с наночастицами, инкапсулированы в наночастицах или конъюгированы с наночастицами с адъювантом или без него. Инкапсулирование в липосомы описано, например, в US 4235877. Конъюгирование с макромолекулами раскрыто, например, в US 4372945 или US 4474757. В других вариантах осуществления F-белки RSV собирают в сборки мультимеров более высоких порядков.

В других вариантах осуществления композиции не содержат адъювантов.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы получения вакцины против респираторного синцитиального вируса (RSV), предусматривающие обеспечение композиции в соответствии с настоящим изобретением и помещение ее в фармацевтически приемлемую композицию. Термин "вакцина" относится к средству или композиции, содержащим активный компонент, который является эффективным для индуцирования у субъекта определенной степени иммунитета к определенному патогенному микроорганизму или заболеванию, которые приведут по меньшей мере к снижению (до полного отсутствия включительно) тяжести, продолжительности или другого проявления симптомов, ассоциированных с инфекцией, вызванной патогенным микроорганизмом, или заболеванием. В настоящем изобретении вакцина содержит эффективное количество F-белка RSV до слияния, и/или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей F-белок RSV до слияния, и/или вектор, содержащий указанную молекулу нуклеиновой кислоты, которое вызывает формирование иммунного ответа на F-белок 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. В соответствии с настоящим изобретением термин "вакцина" подразумевает, что она представляет собой фармацевтическую композицию и, таким образом, обычно включает фармацевтически приемлемые разбавитель, носитель или наполнитель. Она может содержать дополнительные активные ингредиенты или не содержать их. 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-белков RSV в композиции для однократного введения может составлять, например, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 10 мг, например 1 мкг - 1 мг, например 10 мкг - 100 мкг. Определение рекомендуемой дозы будет осуществляться в процессе эксперимента и является стандартным для специалистов в данной области.

Введение композиций в соответствии с настоящим изобретением можно осуществлять с помощью 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 композиции вводят путем внутримышечной инъекции. Специалисту в данной области известны различные варианты введения композиции, например вакцины, для индуцирования иммунного ответа на антиген (антигены), присутствующий (присутствующие) в вакцине.

Субъект, как используется в данном документе, предпочтительно представляет собой млекопитающее, например грызуна, например мышшь, хлопкового хомяка, или примата, отличного от человека, или человека. Предпочтительно субъектом является субъект-человек.

Белки, молекулы нуклеиновых кислот, векторы и/или композиции также можно вводить в виде примирования или в виде усиления в гомологичном или гетерологичном режиме примирования/усиления. При осуществлении бустерной вакцинации, как правило, такую бустерную вакцину будут вводить одному и тому же субъекту с промежутком времени от одной недели до одного года, предпочтительно от двух недель до четырех месяцев, после введения композиции субъекту в первый раз (что в данном случае называется "примирующей вакцинацией"). В определенных вариантах осуществления введение предусматривает примирование и по меньшей мере одно бустерное введение.

Кроме того, белки по настоящему изобретению могут применяться в качестве диагностического средства, например для тестирования иммунного статуса индивидуума путем установления способности антител в сыворотке крови такого индивидуума к связыванию с белком по настоящему изобретению. Таким образом, настоящее изобретение также относится к *in vitro* диагностическому способу выявления у пациента наличия инфекции, вызванной RSV, при этом указанный способ включает стадии а) приведения биологического образца, полученного от указанного пациента, в контакт с белком в соответствии с настоящим изобретением и б) выявления присутствия комплексов антитело-белок.

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

Примеры

Пример 1. Получение стабильного F-полипептида RSV до слияния с SEQ ID NO: 21.

Для увеличения стабильности F-белка RSV в конформации до слияния в вариант F-белка RSV до слияния, который был описан ранее (WO 2014/174018 и WO 2014/202570), вводили две дополнительные аминокислотные замены. Конструкции синтезировали и подвергали оптимизации по кодомам в Gene Art (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния). Конструкции клонировали в pCDNA2004 или создавали с помощью стандартных способов, широко известных в данной области, включая сайт-направленный мутагенез и ПЦР, и проводили секвенирование. Используемой системой экспрессии были клетки 293Freestyle (Life Technologies). Клетки подвергали временной трансфекции с помощью 293Fectin (Life Technologies) в соответствии с инструкциями изготовителя 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 подвергали стерилизующей фильтрации с применением вакуумного фильтра с размером пор 0,22 мкм и хранили при 4°C до применения.

Пример 2. Очистка F-белка RSV до слияния.

Рекомбинантный полипептид 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 колонку HiTrap Capto S объемом 5 мл при скорости 5 мл/мин. Затем колонку промывали 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, 1 M 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. 1 представлена хроматограмма содержимого гель-фильтрационной колонки. Главный пик содержал F-белок RSV до слияния. Фракции, составляющие этот пик, снова объединяли, и определяли концентрацию белка при OD280, и хранили при 4°C до применения. На фиг. 2 представлен результат SDS-PAGE-анализа в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях для конечного препарата белка, и, как можно увидеть, чистота составляла

>95%. Идентичность полосы подтверждали с помощью вестерн-блоттинга и специфических к F-белку антител (не показано).

Для определения концентрации белка в образцах супернатанта использовали систему количественного анализа Octet (интерферометрия биослоя). CR9501 (антитело, специфично распознающее F-белок RSV до слияния) и CR9503 (распознающее F-белок RSV после слияния) биотинилировали в соответствии со стандартными протоколами 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 рассчитывали с применением калибровочной кривой. Калибровочную кривую получали для каждого покрытого антитела с применением F-белка RSV до слияния (Kragup et. al., 2015, выше), разведенного в контроле среды (фиг. 3). Анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения ForteBio Data Analysis 6.4 (ForteBio).

Пример 3. Термостабильность F-белка RSV.

Термостабильность очищенного белка определяли с помощью дифференциальной сканирующей флуорометрии (DSF). Очищенный F-белок до слияния смешивали с оранжевым флуоресцентным красителем SYPRO (Life Technologies S6650) в 96-луночном планшете для оптической qPCR. Оптимальную концентрацию красителя и белка определяли экспериментально (данные не показаны). Разведения белка выполняли в PBS, а в качестве вычитаемого эталонного значения использовали значения образца отрицательного контроля, содержащего только краситель. Измерение проводили с помощью прибора для qPCR (Applied Biosystems ViiA 7) с использованием следующих параметров: температурный диапазон 25-95°C со скоростью 0,015°C/с. Данные собирали в непрерывном режиме. Кривые плавления строили с применением программного обеспечения GraphPad PRISM (версия 5.04). Значения температуры плавления рассчитывали при 50% значении максимальной флуоресценции с применением нелинейного уравнения сдвига EC50. Температура плавления F-белка RSV с SEQ ID NO: 21 составляла 68,5° (фиг. 4). Контрольный F-белок RSV до слияния без замен в положениях 357 и 371 имел температуру плавления, составляющую 65,0, что значит, что двойная мутация повышала температуру плавления на 3,5°.

Таблица 1. Стандартные аминокислоты, сокращения и свойства

Аминокислота	3-буквенный код	1-буквенный код	Полярность боковой цепи	Заряд боковой цепи (pH 7,4)
аланин	Ala	A	неполярная	Нейтральный
аргинин	Arg	R	полярная	Положительный
аспарагин	Asn	N	полярная	Нейтральный
аспарагиновая кислота	Asp	D	полярная	Отрицательный
цистеин	Cys	C	неполярная	Нейтральный

глутаминовая кислота	Glu	E	полярная	Отрицательный
глутамин	Gln	Q	полярная	Нейтральный
глицин	Gly	G	неполярная	Нейтральный
гистидин	His	H	полярная	Положительный (10%) ; нейтральный (90%)
изолейцин	Ile	I	неполярная	Нейтральный
лейцин	Leu	L	неполярная	Нейтральный
лизин	Lys	K	полярная	Положительный
метионин	Met	M	неполярная	Нейтральный
фенилаланин	Phe	F	неполярная	Нейтральный
пролин	Pro	P	неполярная	Нейтральный
серин	Ser	S	полярная	Нейтральный
треонин	Thr	T	полярная	Нейтральный
триптофан	Trp	W	неполярная	Нейтральный
тирозин	Tyr	Y	полярная	Нейтральный
валин	Val	V	неполярная	Нейтральный

Таблица 2. Аминокислотные последовательности антител CR9501 и CR9502

Ab	Домен VH	CDR1 VH	CDR2 VH	CDR3 VH
CR9501	Аминокислоты	GASINSDNYWT	HISYTGNTYYTPSLK	CGAYVLISNCGWFDSD
	1-125 из SEQ ID NO: 16	(SEQ ID NO:1)	S (SEQ ID NO:2)	(SEQ ID NO:3)
CR9502	Аминокислоты	GFTFSGHGHTIA	WVSTNNGNTEYAQKI	EWLVMGGFAFDH
	1-121 из SEQ ID NO: 18	(SEQ ID NO:7)	QG (SEQ ID NO:8)	(SEQ ID NO:9)
Ab	Домен VL	CDR1 VL	CDR2 VL	CDR3 VL
CR9501	Аминокислоты	QASQDISTYLN	GASNLET	QQYQYLPYT
	1-107 из SEQ ID NO: 17	(SEQ ID NO:4)	(SEQ ID NO:5)	(SEQ ID NO:6)
CR9502	Аминокислоты	GANNIGSQNVH	DDRDRPS	QVWDSSRDQAVI
	1-110 из SEQ ID NO: 19	(SEQ ID NO:10)	(SEQ ID NO:11)	(SEQ ID NO:12)

Последовательности.

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

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
ELSNIKENKCNIGTDAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK

KTNVTLSKKRRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSV
 LTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSSEV
 NLCNVDFINPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIR
 KSDELLHNVNAVKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIA
 FSN

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

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITI
 ELSNIKETKNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRAREAPQYMNITINTTK
 NLNVSISKRRRFLGFLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLNNGVSV
 LTSKVLDLKNYINNQLLPIVNNQSCSISNIETVIEFQQKNSRLLEINREFSVNAGVTPPLSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSSEV
 SLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKNLYVKGEPIINYYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIR
 RSDELLHNVNTGKSTTNIMITTIIIVIIIVILLSLIAIGLLLYCKAKNTPVTLSKDQLSGINNIA
 FSK

SEQ ID NO: 14 (фибрин)

GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

Полноразмерная последовательность F-белка RSV CL57-v224 (SEQ ID NO: 20)

MELPILKTNAITTILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI
 KENKNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPAANNRARELPRFMNYTLNNTKNNNV
 LSKRRRFLGFLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKV
 LDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSE
 LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP
 LCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSSEVNL
 CNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSNKG
 VDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRK
 SDELLHNVNVGKSTTNIMITTIIIVIIIVILLLLIAVGLFLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIA
 FSN

F-белок RSV с N67I, S215P, D486N, и 357K, и 371Y (SEQ ID NO: 21)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI

ELSNIKEIKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAK
 KTNVTLSSKKRKRRLGFLGVSASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSV
 LTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYM
 LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
 LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAEKCKVQSNRVFCDTMYSLTLPSEV
 NLCNVDFINPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSGNGCDYVS
 NKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIR
 KSEDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

Тяжелая цепь CR9501 (SEQ ID NO: 16) :

QVQLVQSGPGLVKPSQTLALTCNVSGASINSDNYWTWIRQRPGGGLEWIGHISYTGNT
 YYTPSLKSRLSMSLETSQSQFSLRLTSVTAADSAVYFCAACGAYVLISNCWFDSWGQGTQVTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSC

Легкая цепь CR9501 (SEQ ID NO: 17) :

EIVMTQSPSSLSASIGDRVTITCQASQDISTYLNWYQQKPGQAPRLLIYGASNLETGVP
 SRFTGSGYGTDFSVTISSLQPEDATYYCQYQYLPYTFAPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSTLTLSKADYE
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Тяжелая цепь CR9502 (SEQ ID NO: 18) :

EVQLLQSGAELKKPGASVKISCKTSGFTFSGHTIAWVRQAPGGGLEWMGWVSTNNGNTE
 YAQKIQGRVMTMDTSTSTVYMELRSLTSDDTAVYFCAREWLVMGGFAFDHWGQGTLLTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSC

Легкая цепь CR9502 (SEQ ID NO: 19) :

QSVLTQASSVSVAPGQTARITCGANNIGSQNVHWYQQKPGQAPVFLVYDDRDRPSGIPD
 RFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRDQAVIFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP
 SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ
 WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTIAPTECS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Стабильный рекомбинантный белок слияния (F) респираторно-синцитиального вируса (RSV) до слияния, содержащий мутацию аминокислоты S в положении 215 в Р (S215P), мутацию аминокислоты Т в положении 357 в К (Т357К) и мутацию аминокислоты N в положении 371 в Y (N371Y), где указанные аминокислотные положения относятся к SEQ ID NO: 13.

2. F-белок RSV до слияния по п.1, содержащий по меньшей мере одну дополнительную мутацию, выбранную из группы, состоящей из

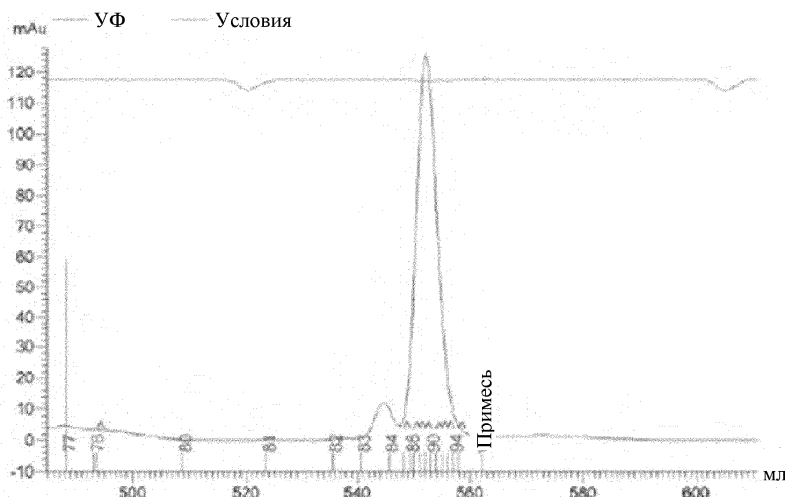
- (a) мутации аминокислотного остатка N/T в положении 67 в I;
- (b) мутации аминокислотного остатка D в положении 486 в N.

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

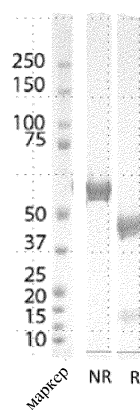
4. F-белок RSV до слияния по любому из предыдущих пунктов, где белок является тримерным.
5. F-белок RSV до слияния по любому из предыдущих пунктов, содержащий усеченный домен F1 и гетерологичный домен тримеризации, связанный с указанным усеченным доменом F1.
6. F-белок RSV до слияния по п.5, где гетерологичный домен тримеризации содержит аминокислотную последовательность GYIPEAPRDGQAYVRKDGGEVLLSTFL (SEQ ID NO: 14).
7. F-белок RSV до слияния по п.5 или 6, где домен тримеризации связан с аминокислотным остатком 513 F-белка RSV.
8. F-белок RSV до слияния по любому из предыдущих пунктов, где F-белок RSV содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 21.
9. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая F-белок RSV до слияния по любому из предыдущих пп.1-8.
10. Молекула нуклеиновой кислоты по п.9, где молекула нуклеиновой кислоты была оптимизирована по кодам для экспрессии в клетках млекопитающего.
11. Экспрессионный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.9 или 10.
12. Композиция для индуцирования иммунного ответа на F-белок RSV, содержащая F-белок RSV до слияния по любому из пп.1-8, молекулу нуклеиновой кислоты по п.9 или 10 и/или вектор по п.11.
13. Применение F-белка RSV до слияния по любому из пп.1-8 в индуцировании иммунного ответа на F-белок RSV.
14. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по п.9 или 10 в индуцировании иммунного ответа на F-белок RSV.
15. Применение вектора по п.11 в индуцировании иммунного ответа на F-белок RSV.

ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ

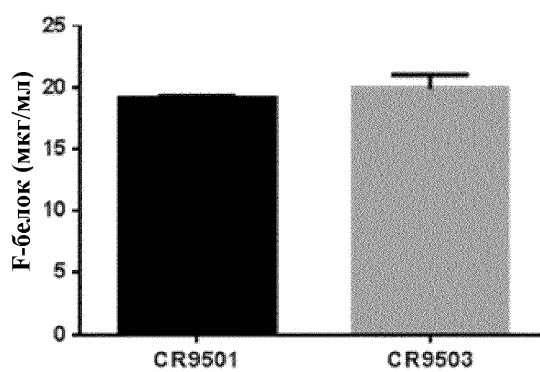
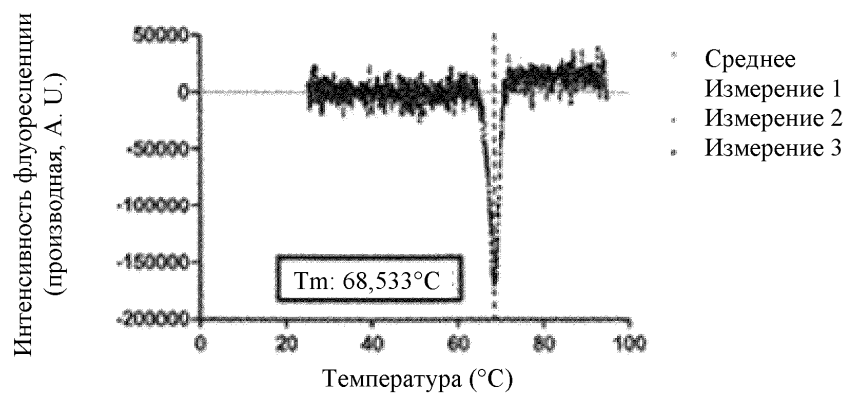
Колонка:	Superdex200 16/600
Буфер:	40 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7,5
Петля (мл):	4
Объем образца (мл):	0,82
Расход (мл/мин.):	1,0
Фракции (мл):	1 мл
Температура, °C:	18
Комментарии:	



Фиг. 1



Фиг. 2

RSV150688Антитело
Фиг. 3

Фиг. 4

