

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190136** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.05.14

(22) Дата подачи заявки
2019.07.30

(51) Int. Cl. *A61K 38/10* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/155 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07K 14/135 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ОЧИСТКИ АНТИГЕНА**

(31) **62/712,280**

(32) **2018.07.31**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2019/056501**

(87) **WO 2020/026147 2020.02.06**

(71) Заявитель:

**ГЛАКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛС СА (BE)**

(72) Изобретатель:

**Бакши Кунал, Буньо Марцин
Кшиштоф, Чандрамоули Сумана,
Тайсон Мэттью Альберт, Ван Цзыхао,
Уилсон Марк Джонатан (US)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Предложены способы, композиции, процессы и виды применения, относящиеся к рекомбинантному растворимому полипептиду белка F RSV.

A1

202190136

202190136

A1

PCT/IB2019/056501

МПК: *A61K 38/10* (2006.01) *A 61P 43/00* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *C07K 14/135* (2006.01)
A61K 39/155 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

СПОСОБ ОЧИСТКИ АНТИГЕНА

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложены способы и композиции для очистки антигенов из различных образцов, а также способы и композиции для применения таких антигенов.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Респираторно-синцитиальный вирус (RSV) является важным патогеном человека, относящимся к семейству Paramyxoviridae. Близкородственные вирусы включают вирусы эпидемического паротита, кори и парагриппа. RSV является ведущей причиной госпитализации детей, а инфицирование в раннем детстве в значительной степени коррелирует со свистящими хрипами и повышенной частотой развития астмы в детском возрасте. Это приводит в результате к значительной нагрузке на детей, родителей и системы здравоохранения, а затраты на вмешательства оцениваются в миллиарды долларов ежегодно. После малярии он является единственной наиболее частой причиной смертности у детей в возрасте от 1 месяца до 1 года.

Вакцины против RSV в настоящее время не существует, и единственным способом вакцинации является пассивное введение моноклонального антитела паливизумаб, нацеленного на белок слияния F. Из-за непомерно высокой стоимости этой стратегии ее применяют ограниченно только у младенцев из группы повышенного риска в начале ежегодного сезона заболеваемости RSV, и, кроме того, недооценивается необходимость в широкодоступной эффективной вакцине. С другой стороны, с учетом защиты, обеспечиваемой моноклональным антителом, можно предполагать, что гуморальный иммунитет против этого вируса эффективен в профилактике инфекции.

Белок F RSV, который является основной мишенью нейтрализующих антител к этому вирусу, представляет собой гликопротеин слияния класса I, присутствующий в большом количестве на оболочке вируса. Как и другие вирусные белки слияния, белок F присутствует на поверхности вируса в тримерном состоянии «предслияния». Как только включается механизм проникновения в клетку, его гидрофобные петли слияния встраиваются в клеточную мембрану и претерпевают значительные конформационные

изменения, в результате чего он укладывается в энергетически выгодное тримерное состояние «постслияния», в процессе которого вирусная и клеточная мембраны сливаются вместе.

Последовательность предшественника белка F RSV содержит сигнальный пептид (25 остатков), эктодомен из 529 остатков, включающий 3 гептадных повтора (HRA, HRB и HRC), трансмембранную область и короткий цитоплазматический «хвост». Белок дикого типа экспрессируется в виде единого полипептида (F₀), который, в конечном счете, расщепляется внутри в двух сайтах расщепления фурином. В результате фуринового протеолиза высвобождается 27-аминокислотный пептид (p27), и белок разделяется на две цепи F1 и F2, которые остаются связанными двумя дисульфидными связями (C37–C439; C69–C212). В результате этих расщеплений N-конец гидрофобного пептида слияния (N-конец F1) высвобождается и становится доступным для окончательного встраивания в мембрану, что позволяет белку F функционировать в качестве фузогена. Конечный зрелый белок F RSV также гликозилирован в трех N-сшитых сайтах гликозилирования (N27, N70 и N500).

Экзогенно экспрессируемый эктодомен F самопроизвольно укладывается с образованием высокостабильного тримера в конформации постслияния. Выяснена кристаллическая структура белка F, образованная в результате слияния, в которой показано сохранение двух важных экспонируемых на поверхности нейтрализующих эпитопов — сайта A и сайта C.

Структура предслияния белка F была выяснена путем совместной экспрессии эктодомена F с Fab-фрагментом антитела, специфичного к белку F до слияния. Это антитело и два родственных антитела распознают эпитоп на белке F, который является уникальным для его конформации предслияния и обозначен как сайт Ø. Этот эпитоп находится вблизи «верхушки» молекулы и образован остатками 60–75 (F2) и остатками HRA-спирали 196–209 (F1). При значительной структурной перестройке, которая происходит при переходе F в конформацию предслияния, этот эпитоп разрушается, при этом положение петли по отношению к HRA-спирали в молекулах до и после слияния меняется примерно на 180°. Напротив, два других нейтрализующих сайта в белке F — сайт A и сайт C — сохраняются в обеих конформациях «предслияния» и «постслияния». Сайт V четвертичного эпитопа перекрывается с β_3 – β_4 мотивом и присутствует на тримерной форме RSV-F до слияния. См. McLellan et al (2015) Characterization of a Prefusion-Specific Antibody That Recognizes a Quaternary, Cleavage-

Dependent Epitope on the RSV Fusion Glycoprotein, *PLOS Pathog*, 11:e1005035. Сайт V показан на Фиг. 2.

Для стабилизации эктодомена F в его конформации предслияния требуется три основных изменения в последовательности эктодомена. Необходима С-концевая тримеризация домена. Примером является домен сборки, представляющий собой домен из 27 остатков с С-конца молекулы фибритина бактериофага T4, который самопроизвольно тримеризуется при экспрессии. В отсутствие этого домена, но при дополнительных изменениях белок F будет принимать конформацию предслияния, но не способен образовать тримеры и не обладает высокой иммуногенностью. Домен сборки связан с С-концом F посредством короткого нерасщепляемого линкера из 4 остатков Ser-Ala-Ile-Gly.

Два других изменения представляют собой стабилизирующие мутации, сконструированные на основании связывающей антитело структуры, чтобы способствовать поддержанию белка F в состоянии предслияния без присоединения антитела. После нескольких повторений тестирования/конструирования наилучшие результаты были получены для двух серий мутаций. Эта молекула, названная DS-Cav1 в работе McLellan et. al. *Science* (2013) vol. 342 p. 592), содержит дисульфид (DS), встроенный путем замены двух остатков Ser в положениях 155 и 290 на Cys (S155C-S290C), чтобы предотвратить ее переход в состояние постслияния. Она также содержит заполняющие просвет мутации S190F и V207L, чтобы стабилизировать сайт Ø на верхушке. Этот растворимый полипептид белка F RSV, содержащий замены S155C, S290C, S190F и V207L, вызывает образование нейтрализующих антител со значительно более высокой активностью, чем F после слияния, и способен к истощению более 85 % RSV-специфичных нейтрализующих антител в сыворотке крови человека.

Несмотря на то, что в настоящее время доступны опубликованные способы получения растворимого полипептида белка F RSV в количествах лабораторного масштаба, сохраняется необходимость в чистом и стабильном растворимом полипептиде белка F RSV, не содержащем аффинную метку, т. е. немеченом; аффинная метка может сама по себе индуцировать ложный иммунный ответ, или даже при ее отщеплении может создать искусственную аминокислотную последовательность после расщепления, которая может индуцировать ложный иммунный ответ. Кроме того, при получении рекомбинантными методами в достаточных количествах для применения в вакцине этот растворимый полипептид белка F RSV очищается вместе с белками клетки-хозяина, которые могут снижать иммуногенность, вызывать протеолиз

рекомбинантного продукта или индуцировать иммунный ответ. Соответственно, сохраняется необходимость в получении чистого и стабильного растворимого полипептида белка F RSV в масштабе производства вакцины, по существу свободного от белков клетки-хозяина.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем документе автором изобретения предложены способы изготовления композиции не содержащего метку рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV высокой степени очистки, содержащего замены S155C, S290C, S190F и V207L, способы изготовления его композиций высокой стабильности, а также композиции и способы применения рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV высокой степени очистки. В одном аспекте предложена антигенная композиция, содержащая совокупность тримеров рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, где каждый тример в указанной совокупности состоит из трех рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV, независимо выбранных из группы, состоящей из: (а) рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, содержащего цепь F1, имеющую замены S155C, S290C, S190F и V207L (F-протомер); и (б) рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, содержащего цепь F1, имеющую замены S155C, S290C, S190F и V207L, дополнительно содержащего по меньшей мере 10 аминокислот пептида p27 (F'-протомер), описанных формулой

$$nF + (3-n)F' \quad (\text{Формула I}),$$

где n представляет собой целое число 0–3, F представляет собой F-протомер, и F' представляет собой F'-протомер, где по меньшей мере 1%, например по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 11%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 13%, по меньшей мере 14%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25% рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV в совокупности тримеров представляет собой F'-протомеры.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ/ФИГУР

ФИГ.1А. В схематичной форме изображена последовательность белка F RSV дикого типа: сигнальный пептид (25 остатков), эктодомен из 529 остатков, включающий 3 гептадных повтора (HRA, HRB и HRC), трансмембранная область (TM),

короткий цитоплазматический хвост, сайты гликозилирования (G в окружности) и сайты расщепления фурином (ножницы). В процессе созревания белка происходит удаление сигнального пептида (SP) и пептида p27, в результате чего образуются цепи F1 и F2 (символ ромбик обозначает сайт после расщепления, остающийся после удаления p27).

ФИГ. 1В. Показан рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV с заменами S155C, S290C, S190F и V207L (вертикальное расположение букв) и домен сборки; другие обозначения на фигуре являются такими, как описано для ФИГ. 1А.

ФИГ. 2. Показаны различные сайты связывания антитела на графическом изображении белка предслияния F RSV, включая сайт Ø.

ФИГ. 3А. Зависимость плотности жизнеспособных клеток и жизнеспособность клона клеток яичника китайского хомячка (CHO), продуцирующего рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV от увеличения времени продукции в биореакторе промышленного масштаба.

ФИГ. 3В. Накопление титра рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV в биореакторе промышленного масштаба.

ФИГ. 4. Профиль гликанов рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, полученного раскрытым в примерах способом. Пики №2 и №3 представляют собой сialiрированные гликаны.

ФИГ. 5А. Результаты смещения на эксклюзионной хроматографии (ЭХ) — жидкостной хроматографии (ЖХ) с Fab-фрагментом, полученные после хранения рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV при 5°C в жидком буферном растворе в течение 3 месяцев. См. пример 3(е). Слева направо: пики представляют собой смещенный пик рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV (Shifted); отдельный пик рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV (основной пик, Ds) и несмещенный пик рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV (минорный пик, Unshifted); сайт Ø связывания Fab (основной пик, не отмечен) и сайт Ø связывания Fab Ат (минорный пик, Fab). На панели-вкладке указан процент рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, хроматографический пик которого смещается (сохраняется сайт Ø связывания) в моменты времени 0, через 1 месяц, через 3 месяца и через 7 месяцев (на ФИГ. 5А показана хроматограмма материала только после 3 месяцев).

ФИГ. 5В. Результаты смещения пиков на эксклюзионной хроматографии (ЭХ) — жидкостной хроматографии (ЖХ) с Fab-фрагментом, полученные после хранения

лиофилизированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV в течение 2 недель при 40°C с последующим восстановлением соответствующим буферным раствором; обозначения пиков являются такими же, как описано на ФИГ. 5А.

ФИГ. 5С. Результаты смещения пиков на эксклюзионной хроматографии (ЭХ) — жидкостной хроматографии (ЖХ) с Fab-фрагментом, полученные после хранения лиофилизированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV при 5°C в течение 6 месяцев с последующим восстановлением соответствующим буферным раствором; обозначения пиков являются такими же, как описано на ФИГ. 5А.

ФИГ. 6А. Гель-электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ) свежего материала сравнения рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV (1-я дорожка) и материала рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV 3-месячного исследования стабильности (2-я дорожка) (часть материала 3-месячного исследования стабильности утратила связывание в сайте Ø). Тем не менее, картина полос в геле для свежего материала сравнения и материала 3-месячного исследования стабильности была очень сходной, что позволяет предположить, что утрата связывания в сайте Ø связывания антитела в материале 3-месячного исследования стабильности не связана с явлением клипирования белка.

ФИГ. 6В. Пептидная карта в форме бабочки по данным жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии (ЖХ-МС) свежего материала сравнения рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV (сверху) и материала 3-месячного исследования стабильности (снизу). Картина пептидных отпечатков свежего материала сравнения и материала 3-месячного исследования стабильности была сопоставимой, что позволяет предположить, что химические модификации, такие как окисление, деаминирование и перестановка дисульфидных связей также не вызывают утрату связывания в сайте Ø связывания антитела.

ФИГ. 7. Определение массы де-N-гликозилированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV в интактном состоянии методом ЖХ-МС.

ФИГ. 8. Обратнo-фазовая жидкостная хроматография (ОФ-ВЭЖХ) рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, показывающая элюирование F'-протомера (минорный пик) с последующим элюированием F-протомера (основной пик). Образцы хроматографировали в двух повторах.

ФИГ. 9. Интегрирование пика фармацевтической субстанции (антигенной композиции) на ОФ-ВЭЖХ (p27 обозначает F'; RSV preF обозначает F).

ФИГ. 10. Интегрирование пика фармацевтической субстанции (антигенной композиции) на ОФ-ВЭЖХ при стандартном введении пробы 10 мкл (p27 обозначает F'; RSV preF обозначает F).

ФИГ. 11. Характерный профиль тримеров рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV методом катионообменной хроматографии со слабыми катионами. Пик 1 представляет собой FFF, а пик 2 представляет собой F'-содержащий тример.

ФИГ. 12. Фракции собирали для дальнейшего анализа (затенение серым цветом).

ФИГ. 13. Профиль тримеров рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV методом обратно-фазовой жидкостной хроматографии (меченый RSVPreF3 (первоначально идентифицированный с помощью термина DS-Cav1 и обозначенный в настоящем документе иначе с использованием термина RSVPreF3, чтобы отличить его от материала, полученного, как описано в работе McLellan et. al. Science (2013) vol. 342 p. 592, WO2014160463 и идентификаторе ClinicalTrials.gov: NCT03049488), нижняя линия на графике), пик 1 (вторая линия на графике) и пик 2 (третья линия снизу на графике) катионообменной хроматографии со слабыми катионами.

ФИГ. 14. Профиль рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV +R295 и R295 методом катионообменной хроматографии со слабыми катионами. Самый крайний пик слева (ограниченный пунктирной вертикальной линией) представляет собой время удерживания тримера FFF. Второй пик слева (ограниченный слева пунктирной вертикальной линией полужирным шрифтом) представляет собой время удерживания тримера FFF' (заряд $\Delta+5$). Самые крайние пики справа представляют собой время удерживания тримера R295 F'F'F' (ограниченные справа пунктирной вертикальной линией) (заряд $\Delta+6$). Следует отметить отсутствие пика с прогнозируемым временем удерживания для FF'F' (заряд $\Delta+10$) (серая пунктирная кривая внутри темной окружности полужирным шрифтом).

ФИГ. 15. Высокомолекулярные соединения (HMWS) в RSVPreF3 и DS-Cav1 исследовали с использованием эксклюзионной жидкостной хроматографии высокого давления (Э-ВЭЖХ). На хроматограмме на ФИГ. 15 слева направо изображены пики RSVPreF3 (слева, выше) и DS-Cav1 (справа, короче). Наблюдалась симметричность пика RSVPreF3, тогда как пик DS-Cav1 выглядит несимметричным (большие «плечи» при отсутствии разрешения пиков) в связи с его гетерогенностью.

ФИГ. 16. Седиментация, определяемая методом аналитического ультрацентрифугирования (АУЦ), следующих образцов: Образец 1 лиофилизата RSVPreF3 (пик, отмеченный при 4,05 с); образец 2 лиофилизата RSVPreF3 (пик, отмеченный 3,99 с); жидкий образец RSVPreF3 (пик, отмеченный 4,09 с); жидкий образец DS-Cav1 (пик, отмеченный 4,17 с).

ФИГ. 17А. Содержание белков клетки-хозяина (НСП) исследовали методом электрофореза в ДСН-ПААГ в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях. Слева направо дорожки представляют собой: Маркер размера; RSVPreF3 в невосстанавливающих условиях; DS-Cav1 в невосстанавливающих условиях; RSVPreF3 в восстанавливающих условиях; DS-Cav1 в восстанавливающих условиях; и маркер размера. Следует отметить присутствие минорной полосы, представляющей собой FFF' (F1+p27) непосредственно выше основной полосы RSVPreF3, как в невосстанавливающих, так и в восстанавливающих условиях.

ФИГ. 17В. Вестерн-блоттинг (с геля) с GRP78, обнаруживаемым первым антителом (Ат): Антитело GRP78/BiP (Thermo Fisher Scientific, № по каталогу: PA1-014А, организм-хозяин/изотип: кролик/IgG, поликлональное); второе Ат: меченный Alexa Fluor 647 куриный антикроличий IgG (H+L) (Invitrogen, A21443).

ФИГ. 18. Для исследования содержания действующего вещества и чистоты композиций RSVPreF3 и DS-Cav1 использовали ОФ-ВЭЖХ. Следует отметить отсутствие пика p27 в DS-Cav1 на кривой хроматограммы.

ФИГ. 19. Для исследования совокупностей FFF и FFF' RSVPreF3 и DS-Cav1 использовали метод катионообменной хроматографии со слабыми катионами (Weak Cation Exchange, WCX). На хроматограмме композиции RSVPreF3 показано 2 отдельных симметричных, хорошо разделенных пика (FFF и FFF'), при этом DS-Cav1 представляет собой один относительно широкий пик со временем удерживания между FFF и FFF'.

ФИГ. 20. Определение иммунологических характеристик RSVPreF3 (лиофилизат) у коров путем измерения повышения титров нейтрализующего антитела к RSV А (нАт) в группах, получавших препараты DS-Cav1 или RSVPreF3, по сравнению с группой, получавшей физиологический раствор. D-7 обозначает 7 дней до иммунизации; dPI обозначает дни после иммунизации.

ФИГ. 21. Влияние p27 на иммуногенность у ранее не использованных в экспериментах мышей СВ6F1 оценивали путем определения титров нейтрализующего антитела hRSV А, индуцированных препаратами FFF или FFF' у ранее не

использованных в экспериментах мышей СВ6F1 через 14 дней после иммунизации. FFF' индуцировал не меньший ответ нейтрализующих Ат к RSV А по сравнению с ответами нАт, индуцируемыми FFF.

ФИГ. 22А. Зависимость плотности жизнеспособных клеток и жизнеспособность клона клеток СНО, продуцирующего рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV от увеличения времени продукции в биореакторе промышленного масштаба.

ФИГ. 22В. Накопление титра рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV в биореакторе промышленного масштаба.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Автор изобретения обнаружил, что рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV нестабилен в определенных условиях хранения и претерпевает самопроизвольные конформационные изменения, приводящие к измеримому снижению (методом анализа смещения Fab-фрагмента антитела) связывания антитела в сайте Ø и сайте V, причем эти конформационные изменения влияют на увеличенную долю рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV в условиях хранения в жидком буферном растворе. В настоящем документе предложены композиции и способы ограничения или сведения к минимуму доли рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, претерпевшего это конформационное изменение. В настоящем документе автором изобретения дополнительно предложены антигенные композиции, содержащие рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, имеющий замены S155C, S290C, S190F и V207L, по данным наблюдений обладающий более высокой чистотой, проявляющий меньшую степень агрегации, меньшие количества частичного гликозилирования и имеющий более низкую изоэлектрическую точку (pI) по сравнению с опубликованным ранее рекомбинантным растворимым полипептидом белка F RSV, имеющим замены S155C, S290C, S190F и V207L. Ожидается, что в результате раскрытые в настоящем документе рекомбинантные растворимые полипептиды белка F RSV и способы их изготовления приведут к получению рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV более высокой чистоты, характеризующегося пониженным содержанием белков клетки-хозяина и пониженной агрегацией, меньшими количествами частичного гликозилирования и более низкой pI по сравнению с рекомбинантными растворимыми полипептидами белка F RSV, полученными, как раскрыто в WO2014160463.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Под термином «рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV» или «растворимый полипептид белка F» подразумевают белок F RSV, содержащий замены S155C, S290C, S190F и V207L и включающий в себя домен сборки — тримеризации. Пример такого содержащего замены белка F RSV раскрыт в WO2014160463, где замененные положения аминокислот описаны со ссылкой на последовательность белка F RSV дикого типа, представленную в этом документе идентификатором 124. Рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV экспрессируется в виде единого полипептида (F0), который в конечном счете расщепляется фурином. Пример рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV F0 изображен на ФИГ. 1B, а пример полипептидной последовательности F0 представлен в SEQ ID NO:1. В результате протеолиза фурином белок расщепляется на две цепи: одна содержит аминокислотную последовательность F1, а другая одна содержит аминокислотную последовательность F2, и, таким образом, рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV будет содержать по меньшей мере цепь F1 и цепь F2. В связи с наличием двух сайтов расщепления протеолиз может приводить к образованию двух цепей F1 и F2, а также к высвобождению пептида p27, тем не менее авторы изобретения обнаружили, что фракция зрелого рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV может расщепляться только в одном сайте расщепления фурином, и пептид p27 не высвобождается. Это описано в настоящем документе в других местах.

Под «цепью F1» подразумевают C-концевую часть расщепленной молекулы F0. Пример цепи F1 показан на ФИГ. 1B, а примеры полипептидных последовательностей F1 представлены в SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:8.

Под «цепью F2» подразумевают N-концевую часть расщепленной молекулы F0, из которой удален сигнальный пептид. Пример цепи F2 показан на ФИГ. 1B, а пример полипептидной последовательности F2 представлен в SEQ ID NO:3.

Под «F-протомером», или preF, подразумевают рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, имеющий замены S155C, S290C, S190F и V207L, но в котором отсутствует аминокислотная последовательность p27.

Под «F'-протомером», или preF', подразумевают рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, имеющий замены S155C, S290C, S190F и V207L, но содержащий от по меньшей мере десяти непрерывных аминокислот пептида p27 до полноразмерного p27.

Под «пептидом p27» подразумевают аминокислотную последовательность, соответствующую полноразмерной последовательности аминокислот полипептида (F0), которая должна высвобождаться в результате полного протеолиза в обоих сайтах фурина. В некоторых воплощениях изобретения в результате протеолиза фурином высвобождается 27-аминокислотный пептид p27, который может варьироваться от одного штамма RSV к другому штамму RSV. В некоторых воплощениях изобретения пептид p27 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7.

Под «тримером» или «тримером рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV» подразумевают белковый комплекс из трех рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV, в котором каждый рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV содержит цепь F1 и цепь F2, и в котором дополнительно каждый рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV комплекса независимо выбран из группы, состоящей из: F'- и F-протомера; так, что структура тримера описывается формулой

$$nF + (3-n)F' \quad (\text{Формула I}),$$

где n представляет собой целое число от 0 до 3, F представляет собой F-протомер, а F' представляет собой F'-протомер.

Под «нерасщепленным сайтом расщепления фурином» подразумевают минимальную аминокислотную последовательность ...RXRRX₁... (SEQ ID NO. 9), где X и X₁ представляют собой любые аминокислоты (см., например, Moehring et al. (1993) "Strains of CHO-K1 cells resistant to Pseudomonas exotoxin A and cross-resistant to diphtheria toxin and viruses," *Infect. Immun.* 41: 998–1009.)

Под «антигеном» подразумевают соединение, композицию или вещество, которое может стимулировать выработку антител и/или Т-клеточный ответ у животного, включая композиции, которые вводят животному путем инъекции, абсорбции или иным путем. Соответственно, под термином «антигенный полипептид» подразумевают полипептид, который может стимулировать выработку антител и/или Т-клеточный ответ у животного. Термин «антиген» включает все родственные антигенные эпитопы. Термин «эпитоп» или «антигенная детерминанта» относится к участку на антигене, на который реагируют В- и/или Т-клетки. «Доминантные антигенные эпитопы» или «доминантный эпитоп» представляют собой эпитопы, связывание с которыми вызывает значимый иммунный ответ у хозяина, например,

ответ антител или Т-клеточный ответ. Таким образом, относительно защитного иммунного ответа на патоген доминантными антигенными эпитопами являются те антигенные эпитопы, которые распознаются иммунной системой хозяина и в результате приводят к защите от заболевания, вызванного патогеном. Термин «Т-клеточный эпитоп» относится к эпитопу, который при связывании с соответствующей молекулой главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) специфично связывается с Т-клеткой (посредством Т-клеточного рецептора). «В-клеточный эпитоп» представляет собой эпитоп, который специфично связывается антителом (или молекулой В-клеточного рецептора).

Под «антигенной композицией» подразумевают композицию, содержащую антигенный полипептид (включая формы полипептида более высокого порядка, такие как тример и т. п.), либо два или более других антигенных полипептидов (включая их формы более высокого порядка). Как описано в настоящем документе, антигенную композицию можно подвергать очистке для удаления нежелательных молекул, таких как белки клетки-хозяина, если эта антигенная композиция получена в результате экспрессии антигенного полипептида в клетках-хозяевах, другие загрязняющие молекулы и т. п.

Под «очисткой» подразумевают процесс удаления из композиции компонентов, присутствие которых нежелательно. Термин «очистка» является относительным и не требует, чтобы из композиции были удалены все следы нежелательных компонентов. В контексте производства вакцин очистка включает такие процессы, как центрифугирование, диализ, ионообменная хроматография и эксклюзионная хроматография, аффинная очистка или осаждение. Таким образом, термин «очищенный» не требует абсолютной чистоты; вероятнее, его понимают как относительный термин. Так, например, очищенная антигенная композиция представляет собой композицию, обогащенную заданным антигеном в большей степени, чем содержание антигена в окружении, в котором он образуется, например, в клетке или в камере для биохимических реакций. Препарат по существу чистого антигена можно получить так, чтобы желаемый антиген составлял по меньшей мере 95%, например по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% масс./масс. или более масс./масс. от общего содержания антигена и нежелательных белков в препарате, как определено методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), такого как ИФА Cygnus CHO hcr.

Под «клеткой-хозяином» подразумевают клетку, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный полипептид, такой как рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV в настоящем документе. Примеры клеток-хозяев включают как прокариотические (т. е. бактериальные) клетки-хозяева, такие как *E. coli*, так и многочисленные эукариотические клетки-хозяева, включая клетки грибов (например, дрожжей), клетки насекомых и клетки млекопитающих (такие как клетки CHO, VERO и HEK293).

Под «белком клетки-хозяина», или НСР, подразумевают полипептид, вырабатываемый клеткой-хозяином в отсутствие вектора, кодирующего рекомбинантный полипептид. Например, рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV не может рассматриваться как белок клетки-хозяина, тогда как белок GRP78 следует рассматривать как белок клетки-хозяина.

Под GRP78 подразумевают регулируемый глюкозой белок 78 кДа или белок 5 теплового шока 70 (HSPA5) клетки-хозяина, номер доступа NP_001233668 для CHO.

Под «неагрегированным» в контексте тримера рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV подразумевают тример, имеющий молекулярную массу, прогнозируемую для тримера из трех протомеров, т. е. более 150 кДа, но менее 200 кДа на основании определения методом эксклюзионной жидкостной хроматографии высокого давления (Э-ВЭЖХ) (описанной в другом месте настоящего документа). Напротив, агрегированный тример рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV может присутствовать в виде димерного тримера или тримера еще более высокого порядка.

Под «сиалированным» или «% сиалирования» в контексте рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV подразумевают долю сиалированного гликана от общего количества N-гликана на рекомбинантном растворимом полипептиде белка F RSV, определенного на основании профилирования гликанов, которое проводят следующим образом: сначала отщепляют N-гликаны от рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, затем проводят мечение N-гликанов меткой 2-AB посредством восстановительного аминирования, затем разделяют отщепленные N-гликаны методом гидрофобной жидкостной хроматографии (ГЖХ) и проводят обнаружение и количественное определение идентичности N-гликана в каждом пике с помощью детекторов FLR и масс-спектрометрии (МС).

Под «иммуногенной композицией» подразумевают композицию материала, подходящего для введения субъекту-человеку или животному (например, в

экспериментальных условиях), которая способна вызывать специфичный иммунный ответ, например, против патогена, такого как RSV. Как таковая иммуногенная композиция включает один или более антигенов (например, полипептидные антигены) или антигенных эпитопов. Иммуногенная композиция может также включать в себя один или более дополнительных компонентов, способных вызывать или усиливать иммунный ответ, таких как эксципиент, носитель и/или адъювант. В некоторых случаях иммуногенные композиции вводят, чтобы вызвать иммунный ответ, полностью или частично защищающий субъекта от индуцируемых патогеном симптомов или состояний. В некоторых случаях симптомы или заболевание, вызванные патогеном, предупреждаются (либо уменьшаются или ослабляются) посредством ингибирования репликации патогена (например, RSV) после воздействия патогена на субъект. В контексте данного описания изобретения понимание термина «иммуногенная композиция» будет охватывать композиции, предназначенные для введения субъекту или популяции субъектов с целью вызвать защитный иммунный ответ против RSV до воздействия или паллиативный иммунный ответ против RSV после воздействия (т. е. вакцинные композиции или вакцины).

Под «фармацевтически приемлемым» подразумевают, что определяемый объект пригоден для введения субъекту (например, субъекту-человеку или животному). В Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15-е издание (1975), описаны композиции и препараты (включая разбавители), подходящие для фармацевтической доставки терапевтических и/или профилактических композиций, включая иммуногенные композиции.

Под «адъювантом» подразумевают агент, усиливающий выработку иммунного ответа неспецифическим образом. Распространенные адъюванты включают суспензии минеральных веществ (квасцы, гидроксид алюминия, фосфат алюминия), на которых абсорбируется антиген; эмульсии, в том числе вода-в-масле и масло-в-воде (и их варианты, включая двойные эмульсии и обратимые эмульсии), липосахариды, липополисахариды, иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты (такие как CpG олигонуклеотиды), липосомы, агонисты Toll-подобных рецепторов (в частности, агонисты TLR2, TLR4, TLR7/8 и TLR9) и различные комбинации таких компонентов.

Под «космотропным агентом» подразумевают молекулу или ион, создающие полярную водную структуру и в целом стабилизирующие белки. В некоторых воплощениях изобретения космотропный агент представляет собой полярную или

заряженную молекулу. В некоторых воплощениях изобретения космотропный агент представляет собой заряженный ион соли.

Под «хаотропным агентом» подразумевают молекулу или ион, разрушающие полярную водную структуру, что в целом дестабилизирует белки. В некоторых воплощениях изобретения хаотропный агент представляет собой полярную или заряженную молекулу. В некоторых воплощениях изобретения хаотропный агент представляет собой заряженный ион соли.

АНТИГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ

В некоторых воплощениях изобретения предложены антигенные композиции, содержащие рекомбинантный растворимый полипептид белка F респираторно-синцитиального вируса (RSV), содержащий замены S155C, S290C, S190F и V207L, где указанная композиция содержит более 96%, например более 97%, более 98%, более 99%, более 99,1%, более 99,2%, более 99,3%, более 99,4%, более 99,5%, более 99,6%, более 99,7%, более 99,8% или более 99,9% масс./масс. рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV по сравнению с белком клетки-хозяина. В этом воплощении изобретения массу рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV сравнивают с объединенной общей массой белков клетки-хозяина, добавленной к массе растворимого белка F RSV. Таким образом, в этом воплощении изобретения антигенная композиция может содержать существенное количество других белков, не относящихся к белкам клетки-хозяина, таких как дополнительный рекомбинантный антиген, иммуностимулирующий или адьювантный полипептид и т. п., и, кроме того, содержит, например, по меньшей мере 99,9% масс./масс. рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV по сравнению с белком клетки-хозяина.

Идентичность белков клетки-хозяина может быть определена методом масс-спектрометрии, а присутствующее количество — методом масс-спектрометрии с изотопным разведением, как описано ниже. Антигенную композицию восстанавливают 1,4-дителиотриэтолом (ДТТ) на основании определенных концентраций, алкилируют изоацетамидом и подвергают ферментативному гидролизу трипсином в течение ночи при 37°C. Гидролизат подкисляют и анализируют методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС) с помощью устройства, такого как Thermo Fusion Orbitrap, работающего в информационно-зависимом режиме сбора данных. В перечнях пиков необработанных данных проводят поиск в сравнении с базой данных белков, содержащих антигенную последовательность и последовательности всех известных и спрогнозированных белков клетки-хозяина, с помощью поисковой

системы, такой как поисковая система Marscot. Количественное определение любого загрязняющего или нежелательного белка можно проводить методом масс-спектрометрии с разведением изотопов.

Чтобы определить общее количество всех НСР, можно использовать анализ ИФА. В данной области техники доступны подходящие наборы реактивов для ИФА, и следуют инструкциям производителя. Например, подходящий набор реактивов для НСР из клеток СНО имеется в продаже от компании Cygnus Technologies, LLC, 4332 Southport Supply Rd. SE, г. Саутпорт, штат Северная Каролина, США 28461. См. информацию о продукте ИФА для НСР СНО, 800-F015, ред. 3, 10 января 2018 г., на сайте www-dot-cygnustechnologies.com.

В некоторых воплощениях изобретения предложены антигенные композиции, содержащие рекомбинантный растворимый полипептид белка F респираторно-синцитиального вируса (RSV), содержащий замены S155C, S290C, S190F и V207L, где указанная композиция содержит более 96%, например более 97%, более 98%, более 99%, более 99,1%, более 99,2%, более 99,3%, более 99,4%, более 99,5%, более 99,6%, более 99,7%, более 99,8% или более 99,9% масс./масс. рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV по сравнению с общим содержанием белка.

В некоторых воплощениях изобретения антигенная композиция содержит менее 0,19%, например, менее 0,18%, например, менее 0,17%, 0,16%, 0,15%, 0,14%, 0,13%, 0,12%, 0,11%, 0,10%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,019%, 0,018%, 0,017%, 0,016%, 0,015%, 0,014% или 0,013% масс./масс. белков клетки-хозяина по сравнению с рекомбинантным растворимым полипептидом белка F RSV. В некоторых воплощениях изобретения антигенная композиция содержит менее 0,18%, например менее 0,17%, 0,16%, 0,15%, 0,14%, 0,13%, 0,12%, 0,11%, 0,10%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,019%, 0,018%, 0,017%, 0,016%, 0,015%, 0,014% или 0,013% масс./масс. белков клетки-хозяина по сравнению с общим содержанием белка.

В некоторых воплощениях изобретения единственным белком клетки-хозяина, который можно обнаружить описанным в настоящем документе методом, является белок GRP78 клетки-хозяина. В некоторых воплощениях изобретения антигенная композиция содержит менее 0,18%, например, менее 0,17%, 0,16%, 0,15%, 0,14%, 0,13%, 0,12%, 0,11%, 0,10%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,019%, 0,018%, 0,017%, 0,016%, 0,015%, 0,014% или 0,013% масс./масс. белка GRP78 клетки-хозяина по сравнению с рекомбинантным растворимым полипептидом белка F

RSV. В некоторых воплощениях изобретения антигенная композиция содержит менее 0,18%, например менее 0,17%, 0,16%, 0,15%, 0,14%, 0,13%, 0,12%, 0,11%, 0,10%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,019%, 0,018%, 0,017%, 0,016%, 0,015%, 0,014% или 0,013% м/м белка GRP78 клетки-хозяина по сравнению с общим содержанием белка.

В некоторых воплощениях изобретения единственным белком клетки-хозяина в антигенной композиции, который можно обнаружить описанным в настоящем документе методом, является белок GRP78 клетки-хозяина, и антигенная композиция содержит менее 0,18%, например, менее 0,17%, 0,16%, 0,15%, 0,14%, 0,13%, 0,12%, 0,11%, 0,10%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,019%, 0,018%, 0,017%, 0,016%, 0,015%, 0,014% или 0,013% масс./масс. белка GRP78 клетки-хозяина по сравнению с рекомбинантным растворимым полипептидом белка F RSV. В некоторых воплощениях изобретения единственным белком клетки-хозяина в антигенной композиции, который можно обнаружить описанным в настоящем документе методом, является белок GRP78 клетки-хозяина, и антигенная композиция содержит менее 0,18%, например менее 0,17%, 0,16%, 0,15%, 0,14%, 0,13%, 0,12%, 0,11%, 0,10%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,019%, 0,018%, 0,017%, 0,016%, 0,015%, 0,014% или 0,013% масс./масс. белка GRP78 клетки-хозяина по сравнению с общим содержанием белка.

В некоторых воплощениях изобретения антигенная композиция содержит более 80%, например, более 81%, более 82%, более 83%, более 84%, более 85%, более 86%, более 87%, более 88%, более 89%, более 90%, более 91%, более 92%, более 93%, более 94%, более 95%, более 96% или более 97% масс./масс. неагрегированного тримера по сравнению с агрегированным тримером.

Для определения процента неагрегированного тримера рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV можно использовать Э-ВЭЖХ. Такие эксперименты можно проводить с помощью имеющихся в продаже устройств ВЭЖХ, таких как Waters Alliance с фотодиодно-матричным детектором (ФМД), используя колонки для эксклюзионной хроматографии, такие как колонка TOSOH, TSKgel UltraSW Aggregate, 3 мкм, 300 Å (30 нм), 7,8 x 300 мм, кат. № 228556, и предколонка TOSOH, TSKgel UltraSW Aggregate, 3 мкм, 6 x 40 мм, кат. № A00027. Приемлемым буферным раствором для подвижной фазы является раствор 100 мМ фосфата натрия, 300 мМ хлорида натрия, pH 7,05. Образцы разводят до 220 мкг/мл подвижной фазой, вводят в устройство Э-ВЭЖХ и хроматографируют в течение 30 минут при 0,5 мл/мин.

Затем хроматограммы образцов интегрируют в рамках временного интервала 9–23,5 минут. Для упрощения определения процента низкомолекулярных (НМ) и высокомолекулярных (ВМ) соединений, присутствующих в каждом образце, используют временные группы. Примерные интервалы времен удерживания для временной группы приведены ниже:

- временная группа ВМС 9,0–17,3 мин.
- вершина основного пика присутствует при примерно 17,6–17,8 мин
- временная группа НМС 19,1–23,5 мин.

Процент НМС, основного пика и ВМ соединений, присутствующих на хроматограмме каждого образца рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, рассчитывают с использованием временных групп; все интегрированные площади пиков прибавляют к 100%.

В некоторых воплощениях изобретения гликозилированный рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV имеет молекулярную массу более 59,5 кДа, например более 60,0 кДа, более 60,5 кДа или более 61,0 кДа, включая гликозилирование. Для определения молекулярной массы можно использовать ЖХ-МС.

В некоторых воплощениях изобретения рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV имеет pI менее 7,8, например, менее 7,7, 7,6, 7,5, 7,4, 7,3, 7,2, 7,1, 7,0, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0, 5,9, 5,8, 5,7 или менее 5,4, определенную методом гель-электрофореза с изоэлектрическим фокусированием. В некоторых воплощениях изобретения рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV имеет pI в диапазоне 7,8–5,3, 7,4–5,3, 7,0–5,3, 6,8–5,3, 6,6–5,3, 6,4–5,3, 6,2–5,3 или 6,0–5,3. В некоторых воплощениях изобретения рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV имеет pI в диапазоне 6,0–5,3.

В некоторых воплощениях изобретения рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV содержит гликановые группы, где по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 75% указанных гликановых групп сиалированы, как определено методом профилирования гликанов с помощью ГЖХ-FLR/МС.

Антигенная композиция настоящего документа содержит совокупность тримеров рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, где каждый тример в указанной совокупности состоит из трех рекомбинантных растворимых

полипептидов белка F RSV, независимо выбранных из группы, состоящей из: (а) рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, содержащего цепь F1, имеющую замены S155C, S290C, S190F и V207L (F-протомер); и (б) рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, содержащего цепь F1, имеющую замены S155C, S290C, S190F и V207L, дополнительно содержащего по меньшей мере 10 аминокислот пептида p27 (F'-протомер). В таких воплощениях изобретения тримеры описывают формулой

$$nF + (3-n)F' \quad (\text{Формула I}),$$

где n представляет собой целое число от 0 до 3, F представляет собой F-протомер, а F' представляет собой F'-протомер. В некоторых воплощениях изобретения n представляет собой целое число 1–3. В некоторых воплощениях изобретения n представляет собой целое число 2–3. В некоторых воплощениях изобретения n равно 3. В некоторых воплощениях изобретения по меньшей мере 1%, например по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 11%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 13%, по меньшей мере 14%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20% или по меньшей мере 25% рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV в совокупности тримеров представляет собой F'-протомеры. Разделение рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV на F'-протомеры и F-протомеры и их количественное определение можно проводить методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) в денатурирующих условиях. Как описано в настоящем документе в другом месте, при использовании ОФ-ВЭЖХ тримеры денатурируют на F- и F'-протомеры, а затем эти протомеры разделяют на основании их различий по гидрофобности.

В некоторых воплощениях изобретения по меньшей мере 1%, например, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8% по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 11%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 13%, по меньшей мере 14%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 31%, по меньшей мере 32%, по меньшей мере 33%, по меньшей мере 34%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере

36%, по меньшей мере 37%, по меньшей мере 38%, по меньшей мере 39%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 41%, по меньшей мере 42%, по меньшей мере 43%, по меньшей мере 44%, по меньшей мере 45% указанных тримеров рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV содержат по меньшей мере один F'-протомер. Например, в одном воплощении изобретения наблюдалось, что если приблизительно 20% протомеров представляли собой F', то приблизительно 40% тримеров в совокупности содержали по меньшей мере один протомер F'. Разделение тримеров на тримеры рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV, содержащие по меньшей мере один F'-протомер, и рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV, не содержащие F'1-протомеров (и их количественное определение), можно проводить методом жидкостной ионообменной хроматографии со слабыми катионами (WCX-ЖХ) в естественных условиях. Как описано в настоящем документе в другом месте, при использовании WCX-ЖХ конформация тримеров сохраняется, а затем они разделяются на основании различия их собственных зарядов.

В некоторых воплощениях изобретения F'-протомер содержит цепь F1, содержащую нерасщепленный сайт расщепления фурином. В некоторых воплощениях изобретения F'-протомер имеет молекулярную массу на по меньшей мере 1,0 кДа, например по меньшей мере 1,5 кДа, по меньшей мере 2,0 кДа, по меньшей мере 2,5 кДа, по меньшей мере 3,0 кДа больше, чем молекулярная масса F-протомера. В некоторых воплощениях изобретения соотношение тримеров рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV, содержащих по меньшей мере один F'-протомер, и тримеров рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV, не содержащих F'-протомеров, составляет по меньшей мере 1: 1,2; например, по меньшей мере 1: 1,3; по меньшей мере 1: 1,4; по меньшей мере 1: 1,5; по меньшей мере 1: 1,6; по меньшей мере 1: 1,7; по меньшей мере 1: 1,8; по меньшей мере 1: 1,9; по меньшей мере 1: 2,0; по меньшей мере 1: 2,1; по меньшей мере 1: 2,2; по меньшей мере 1: 2,3; по меньшей мере 1: 2,4; по меньшей мере 1: 2,5; по меньшей мере 1: 2,6; по меньшей мере 1: 2,7; по меньшей мере 1: 2,8; по меньшей мере 1: 2,9; по меньшей мере 1: 3,0; по меньшей мере 1: 3,5; по меньшей мере 1: 4; по меньшей мере 1: 9; по меньшей мере 1: 19 или по меньшей мере 1: 29.

В некоторых воплощениях изобретения совокупность тримеров рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV можно разделить с помощью хроматографии на первый и второй пики, которые можно обнаружить методом седиментации, при этом указанный первый пик имеет коэффициент седиментации

примерно 3,96S, а указанный второй пик имеет коэффициент седиментации примерно 4,13S. Коэффициент седиментации определяют, как описано в Примере 3(Н).

В некоторых воплощениях изобретения рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV содержит цепь F1 и цепь F2, где цепь F1 содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95%-й, по меньшей мере 96%-й, по меньшей мере 97%-й, по меньшей мере 98%-й, по меньшей мере 99%-й идентичностью аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:2. Приемлемо, если цепь F1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. Этим воплощением изобретения описываются оба протомера, F и F'. В некоторых воплощениях изобретения цепь F1 состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2, например, в случае F-протомера.

В некоторых воплощениях изобретения F'-протомер содержит цепь F1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6. В некоторых воплощениях изобретения F'-протомер содержит цепь F1, имеющую N-концевой пептид p27. В некоторых воплощениях изобретения F'-протомер содержит цепь F1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7.

В некоторых воплощениях изобретения рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV содержит цепь F1 и цепь F2, где цепь F2 содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95%-й, по меньшей мере 96%-й, по меньшей мере 97%-й, по меньшей мере 98%-й, по меньшей мере 99%-й идентичностью аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:3. Приемлемо, если цепь F2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, например, состоит из нее. Этим воплощением изобретения описываются оба протомера, F и F'.

В некоторых воплощениях изобретения рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV содержит цепь F1 и цепь F2, где цепь F1 содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95%-й, по меньшей мере 96%-й, по меньшей мере 97%-й, по меньшей мере 98%-й, по меньшей мере 99%-й идентичностью аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:2, а цепь F2 содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95%-й, по меньшей мере 96%-й, по меньшей мере 97%-й, по меньшей мере 98%-й, по меньшей мере 99%-й идентичностью аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:3. Приемлемо, если цепь F1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, например, состоит из нее, а цепь F2 содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:3, например, состоит из нее. Этим воплощением изобретения описываются оба протомера, F и F'. В таких воплощениях изобретения может быть приемлемо, если цепь F1 состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2, например, в случае F-протомера.

В некоторых воплощениях изобретения рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV содержит цепь F1, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95%-й, по меньшей мере 96%-й, по меньшей мере 97%-й, по меньшей мере 98%-й, по меньшей мере 99%-й идентичностью аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:8, а цепь F2 содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95%-й, по меньшей мере 96%-й, по меньшей мере 97%-й, по меньшей мере 98%-й, по меньшей мере 99%-й идентичностью аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:3, например, в случае F'-протомера. Приемлемо, если цепь F1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, например, состоит из нее, а цепь F2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, например, состоит из нее.

В некоторых воплощениях изобретения рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV содержит молекулу F0 полностью, например, до процессинга в ходе экспрессии. В некоторых воплощениях изобретения молекула F0 содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95%-й, по меньшей мере 96%-й, по меньшей мере 97%-й, по меньшей мере 98%-й, по меньшей мере 99%-й идентичностью аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:1. Приемлемо, если цепь F0 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, например, состоит из нее.

В контексте описанных выше воплощений изобретения также можно использовать сконструированные методами геной инженерии варианты рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, имеющие последовательность, обладающую подобием вышеуказанным последовательностям. Специалистам в данной области техники будет понятно, что подобие между последовательностями рекомбинантного растворимого полипептида (и полинуклеотида) белка F RSV, как описано ниже, как и для полипептидных (и нуклеотидных) последовательностей в целом, может быть выражено в терминах «подобие между последовательностями», иначе относящихся к «идентичности последовательности». Идентичность последовательности часто измеряют в процентах идентичности (или подобия); чем выше этот процент, тем в большей степени подобны

первичные структуры двух последовательностей. Как правило, чем большей степенью подобия обладают первичные структуры двух аминокислотных (или полинуклеотидных) последовательностей, тем большей степенью подобия обладают структуры более высокого порядка, образующиеся в результате фолдинга и сборки. Варианты последовательностей рекомбинантного растворимого полипептида (и полинуклеотида) белка F RSV в характерном случае имеют одну или небольшое количество делеций, добавлений или замен аминокислот, но тем не менее они будут обладать очень высоким процентом общей аминокислотной и, как правило, полинуклеотидной последовательности. Еще важнее, что эти варианты сохраняют структурные и, следовательно, конформационные свойства раскрытых в настоящем документе референсных последовательностей.

Методы определения идентичности последовательности хорошо известны в данной области техники и применимы как к рекомбинантным растворимым полипептидам белка F RSV, так и к кодирующим их нуклеиновым кислотам (например, как описано ниже). Различные программы и алгоритмы выравнивания последовательностей описаны в работах: Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Higgins and Sharp, *Gene* 73:237, 1988; Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151, 1989; Corpet et al., *Nucleic Acids Research* 16:10881, 1988; и Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988. Altschul et al., *Nature Genet.* 6:119, 1994, и представлено подробное описание методов выравнивания и расчетов гомологии последовательностей. Программа Национального центра биотехнологической информации (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403, 1990) доступна из нескольких источников, включая Национальный центр биотехнологической информации (NCBI, г. Бетесда, штат Мэриленд, США), а также в Интернете для использования в сочетании с программами анализа последовательностей blastp, blastn, blastx, tblastn и tblastx. Описание определения идентичности последовательности с помощью этой программы имеется на веб-сайте NCBI в Интернете.

В некоторых случаях рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV имеет одну или более модификаций аминокислот относительно аминокислотной последовательности природного штамма, из которого он получен (например, в дополнение к вышеуказанным стабилизирующим модификациям). Такие различия могут представлять собой добавление, делецию или замену одной или более аминокислот. Вариант в характерном случае отличается не более чем на 20%, например

не более чем на 15%, 10%, 5%, 2% или 1% аминокислотных остатков. Например, те, которые имеют делеции до 5 (например, 1 или 2) остатков в 0–5 положениях (например 0, 1 или 2), инсерции до 5 остатков (например, 1 или 2) в 0–5 (пяти) положениях (например, 0, 1 или 2) и замену до 20 остатков (например, до 10 остатков, в частности, до 5 остатков) по сравнению с примерами последовательностей цепи F1, цепи F2, молекулы F0 и пептида p27 SEQ ID NO:1, 2, 3, 6, 7 и 8, которые не изменяют конформацию или иммуногенные эпитопы полученных в результате рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV. Таким образом, вариант рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, как правило, обладает 80%, либо 85%, более характерно по меньшей мере 90% или более, например 95% или даже 98% или 99% идентичностью последовательности с белком сравнения, например, с последовательностями сравнения, проиллюстрированными в примерах последовательностей цепи F1, цепи F2, молекулы F0 и пептида p27 SEQ ID NO:1, 2, 3, 6, 7 и 8 или любого из раскрытых в настоящем документе рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV. Дополнительные варианты, включенные в качестве признака данного описания изобретения, включают варианты, раскрытые в WO2014160463.

В некоторых воплощениях изобретения антигенная композиция содержит тример указанных рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV. Так, в некоторых воплощениях изобретения антигенная композиция содержит тример, включающий в себя три идентичных рекомбинантных растворимых полипептида белка F RSV. В некоторых воплощениях изобретения антигенная композиция содержит тример, включающий в себя по меньшей мере один рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, отличающийся на уровне последовательности от другого рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, входящего в состав тримера. В некоторых воплощениях изобретения антигенная композиция содержит тример из двух идентичных рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV и одного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, отличающегося на уровне последовательности от двух других рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV. В некоторых воплощениях изобретения антигенная композиция содержит три разных рекомбинантных растворимых полипептида белка F RSV (в которых каждый рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV отличается на уровне аминокислотной последовательности).

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, КОДИРУЮЩИЕ РЕКОМБИНАНТНЫЙ РАСТВОРИМЫЙ ПОЛИПЕПТИД БЕЛКА F RSV; СОДЕРЖАЩИЕ ИХ КЛЕТКИ-ХОЗЯЕВА; СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ РАСТВОРИМЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ БЕЛКА F RSV

Другой аспект описания данного изобретения относится к рекомбинантным нуклеиновым кислотам, которые кодируют рекомбинантные растворимые полипептиды белка F RSV, как описано выше. В определенных воплощениях изобретения рекомбинантные нуклеиновые кислоты оптимизированы по кодонам для экспрессии в выбранной прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Чтобы облегчить репликацию и экспрессию, нуклеиновые кислоты могут быть встроены в вектор, такой как прокариотический или эукариотический экспрессионный вектор. Клетки-хозяева, включающие в себя кодирующие рекомбинантные растворимые полипептиды белка F RSV нуклеиновые кислоты, также являются признаком описания данного изобретения. Подходящие клетки-хозяева включают как прокариотические (т. е. бактериальные) клетки-хозяева, такие как *E. coli*, так и многочисленные эукариотические клетки-хозяева, включая клетки грибов (например, дрожжей), клетки насекомых и клетки млекопитающих (такие как клетки CHO, VERO и HEK293).

Примеры методик, достаточных в качестве руководства для обычного специалиста в данной области техники по получению кодирующих рекомбинантные растворимые полипептиды белка F RSV нуклеиновых кислот, можно найти в Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Press, 2001; Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1992 (and Supplements to 2003); и Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, 4th ed., Wiley & Sons, 1999.

Раскрытые в настоящем документе рекомбинантные растворимые полипептиды белка F RSV получают с помощью хорошо разработанных методик экспрессии и очистки рекомбинантных белков. Примеры методик, достаточных в качестве руководства для обычного специалиста в данной области техники, можно найти в следующих ссылках: Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 200; и Ausubel *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., 999. Дополнительные и

конкретные детали представлены в настоящем документе ниже. Описанные выше нуклеиновые кислоты можно соответствующим образом вводить в клетки-хозяева и использовать для получения описанных в настоящем документе рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV.

Клетки-хозяева, включающие в себя кодирующие рекомбинантные растворимые полипептиды белка F RSV нуклеиновые кислоты, таким образом, также являются признаком описания данного изобретения. Эффективные клетки-хозяева включают как прокариотические (т. е. бактериальные) клетки-хозяева, такие как *E. coli*, так и многочисленные эукариотические клетки-хозяева, включая клетки грибов (например, дрожжей, таких как *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*), клетки насекомых, клетки растений и клетки млекопитающих (такие как клетки CHO и HEK293). Нуклеиновые кислоты рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV вводят (например, трансдуцируют, трансформируют или трансфицируют) в клетки-хозяева, например, посредством вектора, такого как экспрессионный вектор. Как описано выше, вектор в наиболее характерном случае представляет собой плазмиду, но такие векторы могут также представлять собой, например, вирусную частицу, фаг и т. д. Примеры соответствующих хозяев экспрессии включают: бактериальные клетки, такие как *E. coli*, *Streptomyces* и *Salmonella typhimurium*; клетки грибов, таких как *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* и *Neurospora crassa*; клетки насекомых, таких как *Drosophila* и *Spodoptera frugiperda*; клетки млекопитающих, такие как 3T3, COS, CHO, ВНК, HEK 293 или клетки меланомы Боуэса (Bowes melanoma); клетки растений, включая клетки водорослей, и т. д.

Клетки-хозяева можно культивировать в традиционных питательных средах, соответствующим образом модифицированных для активации протомеров, отбирать трансформанты или амплифицировать встроенные полинуклеотидные последовательности. Условия культивирования, такие как температура, pH и т. д., как правило, являются такими, которые использовали ранее для отобранной для экспрессии клетки-хозяина, и будут очевидны для специалистов в данной области техники, и в ссылках, цитируемых в настоящем документе, включая, например, Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, третье издание, Wiley-Liss, Нью-Йорк, и ссылках, цитируемых в этой работе. Продукты экспрессии, соответствующие нуклеиновым кислотам по изобретению, могут быть также получены в клетках, отличающихся от клеток животных, таких как клетки растений, дрожжей, грибов, бактерий и т. п. В дополнение к работам Sambrook, Berger и Ausubel сведения,

касающиеся культур клеток, можно найти в работах Payne *et al.* (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc., г. Нью-Йорк, штат Нью-Йорк, США; Gamborg and Phillips (eds) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods* Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) и Atlas and Parks (eds) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, г. Бока-Ратон, штат Флорида, США.

В зависимости от использования, предназначенного для экспрессированного продукта, можно выбрать ряд экспрессионных векторов в бактериальных системах. Например, если для получения антител требуются большие количества полипептида или его фрагментов, предпочтительно использовать векторы, направляющие экспрессию белков слияния на высоком уровне, легко поддающиеся очистке. Такие векторы включают без ограничений многофункциональные векторы *E. coli* для клонирования и экспрессии, такие как BLUESCRIPT (Stratagene), в которых представляющую интерес кодирующую последовательность, например полинуклеотид по изобретению, как описано выше, можно лигировать в вектор в рамку считывания с последовательностями для аминоконцевой трансляции: иницирующий кодон метионина и последующие 7 остатков бета-галактозидазы, продуцирующие каталитически активный слитый белок бета-галактозидазы; рIN векторы (Van Heeke & Schuster (1989) *J Biol Chem* 264: 5503–5509); рЕТ векторы (Novagen, г. Мэдисон, штат Висконсин).

Аналогичным образом в дрожжах, таких как *Saccharomyces cerevisiae*, для получения желаемых продуктов экспрессии можно использовать ряд векторов, содержащих конститутивные или индуцибельные промоторы, такие как промотор альфа-фактора, алкогольоксидазы и PGH (гипофизарный гормон роста). Обзоры см. в работах Berger, Ausubel и, например, Grant *et al.* (1987; *Methods in Enzymology* 153: 516–544). В клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать ряд экспрессионных систем, включая системы на основе как плазмид, так и вирусов.

Клетка-хозяин возможно выбрана по ее способности к модулированию экспрессии встроенных последовательностей или к процессингу экспрессированного белка желаемым образом. Такие модификации белка включают без ограничений гликозилирование (а также, например, ацетилирование, карбоксилирование, фосфорилирование, липидизацию и ацилирование). В условиях клетки-хозяина возможно осуществление посттрансляционного процессинга, который, например, расщепляет форму предшественника на зрелую форму белка (например, под действием

фуриновой протеазы). Различные клетки-хозяева, такие как 3T3, COS, CHO, HeLa, ВНК, MDCK, 293, WI38 и т. д., обладают специфичным клеточным механизмом и характерными механизмами для таких видов посттрансляционной активности и могут быть выбраны так, чтобы обеспечивать правильную модификацию и процессинг внедренного чужеродного белка.

Для долгосрочной продукции раскрытых в настоящем документе рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV с высоким выходом, как правило, используют стабильные экспрессионные системы. Например, для получения клеточных линий, стабильно экспрессирующих рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, его вводят в клетку-хозяина с помощью экспрессионных векторов, которые содержат точки начала репликации вируса или эндогенные экспрессионные элементы и селективный ген-маркер. После введения вектора клетки оставляют для роста на 1–2 дня в обогащенной среде, после чего их переводят в селективную среду. Цель селективного маркера заключается в придании устойчивости к отбору, и его наличие допускает рост и выделение клеток, которые успешно экспрессируют внедренные последовательности. Например, можно вызывать пролиферацию устойчивых групп или колоний стабильно трансформированных клеток с использованием технологий культивирования тканей, соответствующих типу клеток. Клетки-хозяева, трансформированные нуклеиновой кислотой, кодирующей рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, возможно культивируют в условиях, подходящих для экспрессии и выделения кодируемого белка из культуры клеток.

После трансдукции подходящей линии клеток-хозяев и выращивания клеток-хозяев до надлежащей плотности клеток селективный промотор индуцируют надлежащими средствами (например, путем сдвига температуры или химической индукции) и культивируют клетки в течение дополнительного периода времени. Возможно среда включает в себя компоненты и/или добавки, которые снижают деструкцию экспрессируемых белков протеиназами. Например, среда, используемая для культивирования клеток для продукции рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, может включать в себя ингибитор протеазы, такой как хелатирующий агент или низкомолекулярный ингибитор (например, AZ11557272, AS111793 и т. д.), чтобы уменьшить или исключить нежелательное расщепления клеточными или внеклеточными (например, матриксными) протеиназами.

Затем секретлируемый полипептидный продукт выделяют из культуральной среды. Альтернативно клетки можно собирать путем глубинного фильтрования с использованием первичного и вторичного фильтров, центрифугировать, разрушать физическими или химическими средствами и т. д., и полученный в результате неочищенный экстракт оставлять для дальнейшей очистки. Эукариотические клетки или клетки микроорганизмов, используемые для экспрессии белков, можно разрушать любым удобным способом, включая циклы замораживания-оттаивания, обработку ультразвуком, механическое разрушение или использование агентов для лизиса клеток, либо другими способами, хорошо известными специалистам в данной области техники.

СПОСОБЫ ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНЫХ РАСТВОРИМЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ БЕЛКА F RSV

В некоторых воплощениях изобретения предложены способы изготовления антигенных композиций, описанных в настоящем документе в другом месте, включающие культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, кодирующий рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, для экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, затем экспрессированный рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV подвергают процессу очистки, включающему в себя стадию мультимодальной жидкостной хроматографической очистки с использованием связанного с лигандом субстрата, где лиганд может взаимодействовать с белками посредством электростатических взаимодействий, образования водородных связей или гидрофобных взаимодействий, либо их комбинации.

Среды для мультимодальной хроматографии известны специалистам в данной области техники. Например, для взаимодействия с целевой молекулой посредством нескольких типов взаимодействий, включая ионное взаимодействие, образование водородных связей и гидрофобное взаимодействие, можно использовать мультимодальные ионообменные лиганды. В некоторых воплощениях изобретения способ включает сначала внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV в указанный связанный с лигандом субстрат в присутствии буферного раствора для внесения, а затем элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из указанного связанного с лигандом субстрата в присутствии буферного раствора для элюирования.

В некоторых воплощениях изобретения связанный с лигандом субстрат представляет собой мультимодальную анионообменную смолу. В некоторых

воплощениях изобретения лиганд включает в себя N-бензил-N-метилэтанолламин. Мультимодальная анионообменная смола, содержащая N-бензил-N-метилэтанолламин, имеется в продаже от компании GE Healthcare. См. инструкции Capto Adhere Multimodal media instructions, 28-9064-05 AA, доступные по Интернет-адресу www.dot-gehealthcare.com.

В некоторых воплощениях изобретения буферный раствор для элюирования содержит космотропный агент. В некоторых воплощениях изобретения буферный раствор для элюирования содержит хаотропный агент. Космотропные агенты включают HPO_4 , цитрат, SO_4 , F, OAc, CO_2 , SO_2 , SCN, HPO_2 , Mg, Li, Zn, Al, трет-бутанол, трегалозу, глюкозу, пролин и глутамат. Хаотропные агенты включают K, Cs, NH_4 , $(\text{CH}_3)_4\text{N}$, н-бутанол, этанол, гуанидиния хлорид, перхлорат, ацетат, хлорид, бромид, йодид, фенол, 2-пропанол, додецилсульфат натрия, тиомочевину, мочевины, аргинин, лизин и гистидин. См., например, Kgwu et al., (2004) "The Effect of Buffers on Protein Conformational Stability" *Pharmaceutical Technology*, 28: 86–108.

В некоторых воплощениях изобретения буферный раствор для элюирования содержит и космотропный агент, и хаотропный агент. В таких воплощениях изобретения к связанному субстрату прилагаются противодействующие эффекты космотропного агента и хаотропного агента. Наблюдали, что при такой методологии желаемый полипептид элюируется с минимальным количеством сопутствующего нежелательного белка клетки-хозяина. Хотя мультимодальный анионный обмен используется в таких областях применения, как очистка моноклональных антител, ее проводят в проточном режиме и/или при элюировании антитела с использованием буферного раствора с градиентом pH в отличие от настоящего воплощения, в котором используют буферный раствор, содержащий противодействующие космотропные агенты и хаотропные агенты.

В некоторых воплощениях изобретения буферный раствор для элюирования содержит цитратные ионы и аргинин. В некоторых воплощениях изобретения буферный раствор для элюирования содержит в диапазоне 150–350 мМ цитрата натрия, 200–300 мМ цитрата натрия, 225–275 мМ цитрата натрия, 230–270 мМ цитрата натрия, 235–265 мМ цитрата натрия, 240–260 мМ цитрата натрия или 245–255 мМ цитрата натрия; и в диапазоне 200–400 мМ аргинина, 250–350 мМ аргинина, 275–325 мМ аргинина, 280–320 мМ аргинина, 285–315 мМ аргинина, 290–310 мМ аргинина или 295–305 мМ аргинина. В одном воплощении изобретения буферный раствор для элюирования содержит 250 мМ цитрата натрия и 300 мМ аргинина. В некоторых

воплощениях изобретения буферный раствор для элюирования дополнительно содержит 10–30 мМ фосфата натрия, 15–25 мМ фосфата натрия, 16–24 мМ фосфата натрия, 17–23 мМ фосфата натрия, 18–22 мМ фосфата натрия, 19–21 мМ фосфата натрия. В некоторых воплощениях изобретения буферный раствор для элюирования содержит 20 мМ фосфата натрия.

Проводимость раствора электролита является мерой его способности к проведению электричества. Единицей СИ проводимости является сименс на метр (См/м). Миллисименс на сантиметр (мСм/см) представляет собой десятую долю единицы СИ электропроводности сименс на метр. $1 \text{ мСм/см} = 0,1 \text{ С/м}$. Измерения проводимости используют на регулярной основе во многих промышленных областях применения для измерения содержания ионов в растворе. В некоторых воплощениях изобретения для усиления загрузки лиганда представляющим интерес целевым полипептидом проводимость буферного раствора для внесения можно целесообразно регулировать так, чтобы буферный раствор для внесения имел проводимость в диапазоне 20–34 мСм/см, 21–33 мСм/см, 22–32 мСм/см, 23–31 мСм/см, 24–30 мСм/см или 25–29 мСм/см. В некоторых воплощениях изобретения буферный раствор для внесения имеет проводимость 25–29 мСм/см. В некоторых воплощениях изобретения для усиления загрузки лиганда представляющим интерес целевым полипептидом проводимость буферного раствора для внесения можно целесообразно регулировать так, чтобы буферный раствор для внесения имел проводимость в диапазоне 11–34 мСм/см, 13–31 мСм/см, 15–27 мСм/см, 17–25 мСм/см, 19–23 мСм/см или 20–22 мСм/см. В некоторых воплощениях изобретения буферный раствор для внесения имеет проводимость 19–23 мСм/см.

В некоторых воплощениях изобретения буферный раствор для внесения содержит в диапазоне 150–300 мМ, например 175–275 мМ, 200–250 мМ, 210–240 мМ, 220–230 мМ хлорида натрия. В некоторых воплощениях изобретения буферный раствор для внесения содержит 225 мМ хлорида натрия. В некоторых воплощениях изобретения буферный раствор для внесения содержит в диапазоне 100–300 мМ, например 120–250 мМ, 140–225 мМ, 160–200 мМ, 170–190 мМ хлорида натрия. В некоторых воплощениях изобретения буферный раствор для внесения содержит 180 мМ хлорида натрия.

В некоторых воплощениях изобретения буферный раствор для внесения и буферный раствор для элюирования независимо имеют рН в диапазоне 6,5–7,9, 6,6–7,8, 6,7–7,7, 6,8–7,6, 6,9–7,5 или 7,0–7,4. В некоторых воплощениях изобретения буферный

раствор для внесения и буферный раствор для элюирования независимо имеют рН 7,0–7,4.

В некоторых воплощениях изобретения буферный раствор для внесения имеет рН в диапазоне 7,0–8,0, 7,1–7,9, 7,2–7,8 или 7,3–7,7. В некоторых воплощениях изобретения буферный раствор для внесения имеет рН 7,3–7,7.

В некоторых воплощениях изобретения буферный раствор для элюирования имеет рН в диапазоне 6,9–7,9, 7,0–7,8, 7,1–7,7 или 7,2–7,6. В некоторых воплощениях изобретения буферный раствор для элюирования имеет рН 7,2–7,6.

В некоторых воплощениях изобретения предложены способы изготовления антигенных композиций, описанных в настоящем документе в другом месте, включающие культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, кодирующий рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV для экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, и выполнение процесса очистки экспрессированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, включающего в себя очистку мультимодальной жидкостной хроматографией с использованием связанного с лигандом субстрата, содержащего N-бензил-N-метилэтаноламин, где очистка методом жидкостной хроматографии включает в себя стадии: (а) внесение жидкой среды, содержащей рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV на субстрате в буферном растворе для внесения, содержащем 10–30 мМ, например в диапазоне 15–25 мМ, 16–24 мМ, 17–23 мМ, 18–22 мМ, 19–21 мМ фосфата натрия; 150–300 мМ, например, в диапазоне 175–275 мМ, 200–250 мМ, 210–240 мМ, 220–230 мМ хлорида натрия; рН в диапазоне 6,5–7,9, например 6,6–7,8, 6,7–7,7, 6,8–7,6, 6,9–7,5 или 7,0–7,4; и (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из субстрата с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего (i) 150–350 мМ, например, 200–300 мМ, 225–275 мМ, 230–270 мМ, 235–265 мМ, 240–260 мМ или 245–255 мМ цитрата натрия; (ii) 200–400 мМ, например, 250–350 мМ, 275–325 мМ, 280–320 мМ, 285–315 мМ, 290–310 мМ или 295–305 мМ аргинина; и (iii) 10–30 мМ, например, 15–25 мМ, 16–24 мМ, 17–23 мМ, 18–22 мМ, 19–21 мМ фосфата натрия; рН в диапазоне 6,5–7,9, например, 6,6–7,8, 6,7–7,7, 6,8–7,6, 6,9–7,5 или 7,0–7,4.

В некоторых воплощениях изобретения предложены способы изготовления антигенных композиций, описанных в настоящем документе в другом месте, включающие культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, кодирующий рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV для экспрессии

рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, и выполнение процесса очистки экспрессированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, включающего в себя очистку мультимодальной жидкостной хроматографией с использованием связанного с лигандом субстрата, содержащего N-бензил-N-метилэтанолламин, где очистка методом жидкостной хроматографии включает в себя стадии: (а) внесение жидкой среды, содержащей рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV на субстрате в буферном растворе для внесения, содержащем 10–30 мМ, например в диапазоне 15–25 мМ, 16–24 мМ, 17–23 мМ, 18–22 мМ, 19–21 мМ фосфата натрия; 100–300 мМ, например в диапазоне 120–250 мМ, 140–225 мМ, 160–200 мМ, 170–190 мМ хлорида натрия; рН в диапазоне 7,0–8,0, например 7,1–7,9, 7,2–7,8 или 7,3–7,7; и (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из субстрата с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего (i) 150–350 мМ, например, 200–300 мМ, 225–275 мМ, 230–270 мМ, 235–265 мМ, 240–260 мМ или 245–255 мМ цитрата натрия; (ii) 200–400 мМ, например, 250–350 мМ, 275–325 мМ, 280–320 мМ, 285–315 мМ, 290–310 мМ или 295–305 мМ аргинина; и (iii) 10–30 мМ, например, 15–25 мМ, 16–24 мМ, 17–23 мМ, 18–22 мМ, 19–21 мМ фосфата натрия; рН в диапазоне 6,9–7,9, например, 7,0–7,8, 7,1–7,7 или 7,2–7,6.

В некоторых воплощениях изобретения предложены способы изготовления антигенных композиций, описанных в настоящем документе в другом месте, включающие культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, кодирующий рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV для экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, и выполнение процесса очистки экспрессированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, включающего в себя очистку мультимодальной жидкостной хроматографией с использованием связанного с лигандом *Capto Adhere* субстрата, содержащего N-бензил-N-метилэтанолламин, где очистка методом жидкостной хроматографии включает в себя стадии: (а) внесение жидкой среды, содержащей рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV на субстрате в буферном растворе для внесения, содержащем 20 мМ фосфата натрия; 235 мМ хлорида натрия; рН 7,0–7,4; и (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из субстрата с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего (i) 250 мМ цитрата натрия; (ii) 300 мМ аргинина; и (iii) 20 мМ фосфата натрия; рН 7,0–7,4.

В некоторых воплощениях изобретения предложены способы изготовления антигенных композиций, описанных в настоящем документе в другом месте,

включающие культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, кодирующий рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV для экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, и выполнение процесса очистки экспрессированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, включающего в себя очистку мультимодальной жидкостной хроматографией с использованием связанного с лигандом *Capto Adhere* субстрата, содержащего N-бензил-N-метилэтанолламин, где очистка методом жидкостной хроматографии включает в себя стадии: (а) внесение жидкой среды, содержащей рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV на субстрате в буферном растворе для внесения, содержащем 20 мМ фосфата натрия; 225 мМ хлорида натрия; pH 7,0–7,4; и (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из субстрата с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего (i) 250 мМ цитрата натрия; (ii) 300 мМ аргинина; и (iii) 20 мМ фосфата натрия; pH 7,0–7,4.

В некоторых воплощениях изобретения предложены способы изготовления антигенных композиций, описанных в настоящем документе в другом месте, включающие культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, кодирующий рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV для экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, и выполнение процесса очистки экспрессированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, включающего в себя очистку мультимодальной жидкостной хроматографией с использованием связанного с лигандом *Capto Adhere* субстрата, содержащего N-бензил-N-метилэтанолламин, где очистка методом жидкостной хроматографии включает в себя стадии: (а) внесение жидкой среды, содержащей рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV на субстрате в буферном растворе для внесения, содержащем 20 мМ фосфата натрия; 180 мМ хлорида натрия; pH 7,3–7,7; и (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из субстрата с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего (i) 250 мМ цитрата натрия; (ii) 300 мМ аргинина; и (iii) 20 мМ фосфата натрия; pH 7,2–7,6.

В некоторых воплощениях изобретения перед очисткой мультимодальной жидкостной хроматографией рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV подвергают анионообменной хроматографии. В некоторых воплощениях изобретения анионообменная хроматография включает в себя стадии: (а) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на смолу, которая содержит лиганд, несущий четвертичную аминную группу, где смолу уравнивают буферным раствором,

содержащим 10–30 мМ фосфата и 100–130 мМ хлорида натрия, pH 6,0–8,0; и (б) элюирование растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего 10–30 мМ фосфата натрия, 200–250 мМ хлорида натрия, pH 6,0–8,0. Смола для анионообменной хроматографии, несущая четвертичную аминную группу, имеется в продаже, см., например, файл данных по ионообменной хроматографии на Capto Q ImpRes 28-9837-63AC, доступный по адресу в Интернете www-dot-gelifesciences.com/bioprocess. В некоторых воплощениях изобретения анионообменная хроматография включает в себя стадии: (а) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на смолу, которая содержит несущий лиганд субстрат, включая субстрат Capto Q ImpRes, несущий четвертичную аминную группу, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 20 мМ фосфата натрия, 115 мМ хлорида натрия, pH 7,0–7,4; и (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего 20 мМ фосфата натрия, 225 мМ хлорида натрия, pH 7,0–7,4.

В некоторых воплощениях изобретения перед очисткой мультимодальной жидкостной хроматографией рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV подвергают анионообменной хроматографии. В некоторых воплощениях изобретения анионообменная хроматография включает в себя стадии: (а) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на смолу, которая содержит лиганд, несущий четвертичную аминную группу, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 10–30 мМ фосфата и 40–120 мМ хлорида натрия, pH 6,0–8,0; и (б) элюирование растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего 10–30 мМ фосфата натрия, 130–230 мМ хлорида натрия, pH 6,0–8,0. Смола для анионообменной хроматографии, несущая четвертичную аминную группу, имеется в продаже, см., например, файл данных по ионообменной хроматографии на Capto Q ImpRes 28-9837-63AC, доступный по адресу в Интернете www-dot-gelifesciences.com/bioprocess. В некоторых воплощениях изобретения анионообменная хроматография включает в себя стадии: (а) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на смолу, которая содержит несущий лиганд субстрат, включая субстрат Capto Q ImpRes, несущий четвертичную аминную группу, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 20 мМ фосфата натрия, 80 мМ хлорида натрия, pH 7,3–7,7; и (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего 20 мМ фосфата натрия, 180 мМ хлорида натрия, pH 7,3–7,7.

В некоторых воплощениях изобретения предложены способы изготовления антигенных композиций, описанных в настоящем документе в другом месте, включающие культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, кодирующий рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV для экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, и выполнение процесса очистки экспрессированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, включающего в себя стадии: (а) внесение жидкой среды, содержащей рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV на смолу, которая содержит лиганд, несущий четвертичную аминную группу, при этом смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 10–30 мМ фосфата и 100–130 мМ хлорида натрия, pH 6,0–8,0; и (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего 10–30 мМ фосфата натрия, 200–250 мМ хлорида натрия, pH 6,0–8,0; (в) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на связанный с лигандом субстрат, содержащий N-бензил-N-метилэтаноламин, в буферном растворе для внесения, содержащем 10–30 мМ, например, в диапазоне 15–25 мМ, 16–24 мМ, 17–23 мМ, 18–22 мМ, 19–21 мМ фосфата натрия; 150–300 мМ, например, в диапазоне 175–275 мМ, 200–250 мМ, 210–240 мМ, 220–230 мМ хлорида натрия; pH в диапазоне 6,5–7,9, например, 6,6–7,8, 6,7–7,7, 6,8–7,6, 6,9–7,5, 7,0–7,4 или 7,1–7,3; и (г) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из субстрата с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего (i) 150–350 мМ, например, в диапазоне 200–300 мМ, 225–275 мМ, 230–270 мМ, 235–265 мМ, 240–260 мМ или 245–255 мМ цитрата натрия; (ii) 200–400 мМ, например, в диапазоне 250–350 мМ, 275–325 мМ, 280–320 мМ, 285–315 мМ, 290–310 мМ или 295–305 мМ аргинина; и (iii) 10–30 мМ, например, 15–25 мМ, 16–24 мМ, 17–23 мМ, 18–22 мМ, 19–21 мМ фосфата натрия; pH в диапазоне 6,5–7,9, например, в диапазоне 6,6–7,8, 6,7–7,7, 6,8–7,6, 6,9–7,5 или 7,0–7,4.

В некоторых воплощениях изобретения предложены способы изготовления антигенных композиций, описанных в настоящем документе в другом месте, включающие культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, кодирующий рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV для экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, и выполнение процесса очистки экспрессированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, включающего в себя стадии: (а) внесение жидкой среды, содержащей

рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV на смолу, которая содержит лиганд, несущий четвертичную аминную группу, при этом смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 10–30 мМ фосфата и 40–120 мМ хлорида натрия, pH 6,0–8,0; и (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего 10–30 мМ фосфата натрия, 130–230 мМ хлорида натрия, pH 6,0–8,0; (в) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на связанный с лигандом субстрат, содержащий N-бензил-N-метилэтаноламин, в буферном растворе для внесения, содержащем 10–30 мМ, например в диапазоне 15–25 мМ, 16–24 мМ, 17–23 мМ, 18–22 мМ, 19–21 мМ фосфата натрия; 100–300 мМ, например, в диапазоне 120–250 мМ, 140–225 мМ, 160–200 мМ, 170–190 мМ хлорида натрия; pH в диапазоне 7,0–8,0, например в диапазоне 7,1–7,9, 7,2–7,8 или 7,3–7,7; и (г) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из субстрата с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего (i) 150–350 мМ, например, в диапазоне 200–300 мМ, 225–275 мМ, 230–270 мМ, 235–265 мМ, 240–260 мМ или 245–255 мМ цитрата натрия; (ii) 200–400 мМ, например, в диапазоне 250–350 мМ, 275–325 мМ, 280–320 мМ, 285–315 мМ, 290–310 мМ или 295–305 мМ аргинина; и (iii) 10–30 мМ, например, 15–25 мМ, 16–24 мМ, 17–23 мМ, 18–22 мМ, 19–21 мМ фосфата натрия; pH в диапазоне 6,9–7,9, например в диапазоне 7,0–7,8, 7,1–7,7 или 7,2–7,6.

В некоторых воплощениях изобретения предложены способы изготовления антигенных композиций, описанных в настоящем документе в другом месте, включающие культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, кодирующий рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV для экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, и выполнение процесса очистки экспрессированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, включающего в себя стадии: (а) внесение жидкой среды, содержащей рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV на смолу, которая содержит несущий лиганд субстрат, включая субстрат Capto Q ImpRes, содержащий четвертичную аминную группу, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 20 мМ фосфата натрия, 115 мМ хлорида натрия, pH 7,0–7,4; (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего 20 мМ фосфата натрия, 225 мМ хлорида натрия, pH 7,0–7,4; (в) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на связанный с лигандом Capto Adhere субстрат, содержащий N-бензил-N-

метилэтанолламин, в буферном растворе для внесения, содержащем 20 мМ фосфата натрия; 225 мМ хлорида натрия; pH 7,0–7,4; и (г) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из субстрата с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего (i) 250 мМ цитрата натрия; (ii) 300 мМ аргинина; и (iii) 20 мМ фосфата натрия; pH 7,0–7,4.

В некоторых воплощениях изобретения предложены способы изготовления антигенных композиций, описанных в настоящем документе в другом месте, включающие культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, кодирующий рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV для экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, и выполнение процесса очистки экспрессированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, включающего в себя стадии: (а) внесение жидкой среды, содержащей рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV на смолу, которая содержит несущий лиганд субстрат, включая субстрат Capto Q ImpRes, содержащий четвертичную аминную группу, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 20 мМ фосфата натрия, 80 мМ хлорида натрия, pH 7,3–7,7; (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего 20 мМ фосфата натрия, 180 мМ хлорида натрия, pH 7,3–7,7; (в) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на связанный с лигандом Capto Adhere субстрат, содержащий N-бензил-N-метилэтанолламин, в буферном растворе для внесения, содержащем 20 мМ фосфата натрия; 180 мМ хлорида натрия; pH 7,3–7,7; и (г) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из субстрата с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего (i) 250 мМ цитрата натрия; (ii) 300 мМ аргинина; и (iii) 20 мМ фосфата натрия; pH 7,2–7,6.

В некоторых воплощениях изобретения процесс очистки включает стадии: (а) внесение жидкой среды, содержащей рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV на смолу, которая содержит несущий лиганд субстрат, включая субстрат Capto Q ImpRes, содержащий четвертичную аминную группу, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 20 мМ фосфата натрия, 115 мМ хлорида натрия, pH 7,0–7,4; (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего 20 мМ фосфата натрия, 225 мМ хлорида натрия, pH 7,0–7,4; (в) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на связанный с лигандом Capto Adhere субстрат, содержащий

N-бензил-N-метилэтанолламин, в буферном растворе для внесения, содержащем 20 мМ фосфата натрия; 225 мМ хлорида натрия; pH 7,0–7,4; и (г) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из субстрата с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего (i) 250 мМ цитрата натрия; (ii) 300 мМ аргинина; и (iii) 20 мМ фосфата натрия; pH 7,0–7,4.

В некоторых воплощениях изобретения процесс очистки включает стадии: внесение жидкой среды, содержащей рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV на смолу, которая содержит несущий лиганд субстрат, включая субстрат Capto Q ImpRes, содержащий четвертичную аминную группу, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 20 мМ фосфата натрия, 80 мМ хлорида натрия, pH 7,3–7,7; (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV с использованием буферного раствора, содержащего 20 мМ фосфата натрия, 180 мМ хлорида натрия, pH 7,3–7,7; (в) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на связанный с лигандом Capto Adhere субстрат, содержащий N-бензил-N-метилэтанолламин, в буферном растворе для внесения, содержащем 20 мМ фосфата натрия; 180 мМ хлорида натрия; pH 7,3–7,7; и (г) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из субстрата с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего (i) 250 мМ цитрата натрия; (ii) 300 мМ аргинина; и (iii) 20 мМ фосфата натрия; pH 7,2–7,6.

В некоторых воплощениях изобретения перед стадией анионообменной хроматографии рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV подвергают стадии аффиноподобной хроматографии, включающей стадии: (а) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на среду, содержащую декстрансульфат, где смолу уравнивают 40–60 мМ фосфата натрия при pH 6,0–8,0; и (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из среды с использованием буферного раствора, содержащего 10–30 мМ фосфата натрия, 200–270 мМ хлорида натрия, pH 6,0–8,0.

В некоторых воплощениях изобретения перед стадией анионообменной хроматографии рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV подвергают стадии аффиноподобной хроматографии, включающей стадии: (а) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на среду, содержащую декстрансульфат, где смолу уравнивают 30–60 мМ фосфата натрия при pH 6,0–8,0; и (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из среды

с использованием буферного раствора, содержащего 10–30 мМ фосфата натрия, 200–270 мМ хлорида натрия, рН 6,0–8,0.

Содержащая декстрансульфат среда для аффиноподобной хроматографии имеется в продаже, см., например, файл данных по аффинной хроматографии Capto DeVirS 28-9616-49 AA, доступный по адресу в Интернете www-dot-gelifesciences.com/bioprocess. В некоторых воплощениях изобретения аффиноподобная хроматография включает стадии: (а) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на среду Capto DeVirS, содержащую декстрансульфат, где смолу уравнивают 47 мМ фосфата натрия, рН 7,0–7,4; и (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из среды с использованием буферного раствора, содержащего 20 мМ фосфата натрия, 235 мМ хлорида натрия, при рН 7,0–7,4.

В некоторых воплощениях изобретения аффиноподобная хроматография включает стадии: (а) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на среду Capto DeVirS, содержащую декстрансульфат, где смолу уравнивают 40 мМ фосфата натрия, рН 7,1–7,5; и (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из среды с использованием буферного раствора, содержащего 20 мМ фосфата натрия, 240 мМ хлорида натрия, при рН 7,2–7,6.

В некоторых воплощениях изобретения предложены способы изготовления антигенных композиций, описанных в настоящем документе в другом месте, включающие культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, кодирующий рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV для экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, и выполнение процесса очистки экспрессированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, включающего в себя стадии: (а) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV в среду, содержащую декстрансульфат, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 40–60 мМ фосфата натрия при рН 6,0–8,0; (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из среды с использованием буферного раствора, содержащего 10–30 мМ фосфата натрия, 200–270 мМ хлорида натрия, рН 6,0–8,0; (в) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на смолу, содержащую лиганд, несущий четвертичную аминную группу, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 10–30 мМ фосфата и 100–130 мМ хлорида натрия, рН 6,0–8,0; (г) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием

буферного раствора, содержащего 10–30 мМ фосфата натрия, 200–250 мМ хлорида натрия; рН 6,0–8,0; (д) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на связанный с лигандом субстрат, содержащий N-бензил-N-метилэтанолламин, в буферном растворе для внесения, содержащем 10–30 мМ, например, в диапазоне 15–25 мМ, 16–24 мМ, 17–23 мМ, 18–22 мМ, 19–21 мМ фосфата натрия; 150–300 мМ, например, в диапазоне 175–275 мМ, 200–250 мМ, 210–240 мМ, 220–230 мМ хлорида натрия; рН в диапазоне 6,5–7,9, например, 6,6–7,8, 6,7–7,7, 6,8–7,6, 6,9–7,5 или 7,0–7,4; и (е) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из субстрата с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего (i) 150–350 мМ, например, в диапазоне 200–300 мМ, 225–275 мМ, 230–270 мМ, 235–265 мМ, 240–260 мМ или 245–255 мМ цитрата натрия; (ii) 200–400 мМ, например, в диапазоне 250–350 мМ, 275–325 мМ, 280–320 мМ, в диапазоне 285–315 мМ, от 290 до 310 мМ или менее 295–305 мМ аргинина; и (iii) 10–30 мМ, например, в диапазоне 15–25 мМ, 16–24 мМ, 17–23 мМ, 18–22 мМ, 19–21 мМ фосфата натрия; рН 6,5–7,9, например, 6,6–7,8, 6,7–7,7, например, 6,8–7,6, 6,9–7,5 или 7,0–7,4.

В некоторых воплощениях изобретения предложены способы изготовления антигенных композиций, описанных в настоящем документе в другом месте, включающие культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, кодирующий рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV для экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, и выполнение процесса очистки экспрессированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, включающего в себя стадии: (а) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV в среду, содержащую декстрансульфат, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 30–60 мМ фосфата натрия при рН 6,0–8,0; (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из среды с использованием буферного раствора, содержащего 10–30 мМ фосфата натрия, 200–270 мМ хлорида натрия, рН 6,0–8,0; (в) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на смолу, содержащую лиганд, несущий четвертичную аминную группу, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 10–30 мМ фосфата и 40–120 мМ хлорида натрия, рН 6,0–8,0; (г) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего 10–30 мМ фосфата натрия, 130–230 мМ хлорида натрия; рН 6,0–8,0; (д) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на связанный с лигандом субстрат, содержащий N-бензил-N-метилэтанолламин в

буферном растворе для внесения, содержащем 10–30 мМ, например в диапазоне 15–25 мМ, 16–24 мМ, 17–23 мМ, 18–22 мМ, 19–21 мМ фосфата натрия; 100–300 мМ, например в диапазоне 120–250 мМ, 140–225 мМ, 160–200 мМ, 170–190 мМ хлорида натрия; рН в диапазоне 7,0–8,0, например 7,1–7,9, 7,2–7,8 или 7,3–7,7; и (е) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из субстрата с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего (i) 150–350 мМ, например в диапазоне 200–300 мМ, 225–275 мМ, 230–270 мМ, 235–265 мМ, 240–260 мМ или 245–255 мМ цитрата натрия; (ii) 200–400 мМ, например 250–350 мМ, 275–350 мМ, 275–325 мМ, 280–320 мМ, в диапазоне 285–315 мМ, 290–310 мМ или 295–305 мМ аргинина; и (iii) 10–30 мМ, например 15–25 мМ, 16–24 мМ, 17–23 мМ, 18–22 мМ, в диапазоне 19–21 мМ фосфата натрия; рН 6,9–7,9, например 7,0–7,8, 7,1–7,7 или 7,2–7,6.

В некоторых воплощениях изобретения предложены способы изготовления антигенных композиций, описанных в настоящем документе в другом месте, включающие культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, кодирующий рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV для экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, и выполнение процесса очистки экспрессированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, включающего в себя стадии: (а) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV в среду Capto DeVirS, содержащую декстрансульфат, где смолу уравнивают 47 мМ фосфата натрия, рН 7,0–7,4; и (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из среды с использованием буферного раствора, содержащего 20 мМ фосфата натрия, 235 мМ хлорида натрия, при рН 7,0–7,4; (в) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на смолу, содержащую связанный с лигандом Capto Q ImpRes субстрат, содержащий четвертичную аминную группу, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 20 мМ фосфата натрия, 115 мМ хлорида натрия; рН 7,0–7,4; (г) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего 20 мМ фосфата натрия, 225 мМ хлорида натрия; рН 7,0–7,4; (д) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на связанный с лигандом Capto Adhere субстрат, содержащий N-бензил-N-метилэтанолламин, в буферном растворе для внесения, содержащем 20 мМ фосфата натрия; 225 мМ хлорида натрия; рН 7,0–7,4; и (е) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из субстрата с использованием буферного

раствора для элюирования, содержащего (i) 250 мМ цитрата натрия; (ii) 300 мМ аргинина; и (iii) 20 мМ фосфата натрия; pH 7,0–7,4.

В некоторых воплощениях изобретения предложены способы изготовления антигенных композиций, описанных в настоящем документе в другом месте, включающие культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, кодирующий рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV для экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, и выполнение процесса очистки экспрессированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, включающего в себя стадии: (а) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV в среду Capto DeVirS, содержащую декстрансульфат, где смолу уравнивают 40 мМ фосфата натрия, pH 7,1–7,5; и (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из среды с использованием буферного раствора, содержащего 20 мМ фосфата натрия, 240 мМ хлорида натрия, при pH 7,2–7,6; (в) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на смолу, содержащую связанный с лигандом Capto Q ImpRes субстрат, содержащий четвертичную аминную группу, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 20 мМ фосфата натрия, 80 мМ хлорида натрия; pH 7,3–7,7; (г) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего 20 мМ фосфата натрия, 180 мМ хлорида натрия; pH 7,3–7,7; (д) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на связанный с лигандом Capto Adhere субстрат, содержащий N-бензил-N-метилэтаноламин, в буферном растворе для внесения, содержащем 20 мМ фосфата натрия; 180 мМ хлорида натрия; pH 7,3–7,7; и (е) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из субстрата с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего (i) 250 мМ цитрата натрия; (ii) 300 мМ аргинина; и (iii) 20 мМ фосфата натрия; pH 7,2–7,6.

В некоторых воплощениях изобретения перед стадией очистки методом аффинноподобной хроматографии рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV подвергают стадии инактивации вируса. В некоторых воплощениях изобретения после стадии очистки методом аффинноподобной хроматографии рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV подвергают стадии инактивации вируса. В некоторых воплощениях изобретения стадия инактивации вируса включает в себя добавление детергента. В некоторых воплощениях изобретения стадия инактивации вируса включает в себя добавление полисорбата-80 в жидкую среду, содержащую

рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, до концентрации 0,5–2,5% (например, 0,5–1,5%) и инкубации указанной жидкой среды в течение 10–25 часов при температуре 15–25°C. В некоторых воплощениях изобретения стадия инактивации вируса включает в себя добавление полисорбата-80 в жидкую среду, содержащую рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, до концентрации 0,5–1,5% и инкубации указанной жидкой среды в течение 10–25 часов при температуре 15–25°C. В некоторых воплощениях изобретения стадия инактивации вируса включает в себя добавление полисорбата-80 в жидкую среду, доведение концентрации до 1,0% и инкубации указанной жидкой среды в течение 15–20 часов при контролируемой комнатной температуре. В некоторых воплощениях изобретения стадия инактивации вируса включает в себя добавление полисорбата-80 в жидкую среду, доведение концентрации до 2,0% и инкубацию указанной жидкой среды в течение 18–24 часов при контролируемой комнатной температуре.

В некоторых воплощениях изобретения предложены способы изготовления антигенных композиций, описанных в настоящем документе в другом месте, включающие культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, кодирующий рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV для экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, и выполнение процесса очистки экспрессированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, включающего в себя стадии: (а) добавление полисорбата-80 в жидкую среду, содержащую рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, до концентрации 0,5–1,5% и инкубация указанной жидкой среды в течение 10–25 часов при температуре 15–25°C; (б) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV в среду, содержащую декстрансульфат, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 40–60 мМ фосфата натрия при pH 6,0–8,0; (в) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из среды с использованием буферного раствора, содержащего 10–30 мМ фосфата натрия, 200–270 мМ хлорида натрия, pH 6,0–8,0; (г) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на смолу, содержащую лиганд, несущий четвертичную аминную группу, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 10–30 мМ фосфата и 100–130 мМ хлорида натрия, pH 6,0–8,0; и (д) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего 10–30 мМ фосфата натрия, 200–250 мМ хлорида натрия; pH 6,0–8,0; (е) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на связанный с

лигандом субстрат, содержащий N-бензил-N-метилэтаноламин в буферном растворе для внесения, содержащем 10–30 мМ, например, в диапазоне 15–25 мМ, 16–24 мМ, 17–23 мМ, 18–22 мМ, 19–21 мМ фосфата натрия; 150–300 мМ, например, в диапазоне 175–275 мМ, 200–250 мМ, 210–240 мМ, 220–230 мМ хлорида натрия; pH в диапазоне 6,5–7,9, например, 6,6–7,8, 6,7–7,7, 6,8–7,6, 6,9–7,5 или 7,0–7,4; и (ж) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из субстрата с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего (i) 150–350 мМ, например, в диапазоне 200–300 мМ, 225–275 мМ, 230–270 мМ, 235–265 мМ, 240–260 мМ или 245–255 мМ цитрата натрия; (ii) 200–400 мМ, например, в диапазоне 250–350 мМ, 275–325 мМ, 280–320 мМ, в диапазоне 285–315 мМ, 290–310 мМ или 295–305 мМ аргинина; и (iii) 10–30 мМ, например, 15–25 мМ, 16–24 мМ, 17–23 мМ, 18–22 мМ, 19–21 мМ фосфата натрия; pH 6,5–7,9, например, 6,6–7,8, 6,7–7,7, например, 6,8–7,6, 6,9–7,5 или 7,0–7,4. В некоторых воплощениях изобретения за очисткой мультимодальной жидкостной хроматографией следует фильтрование вируса. В некоторых воплощениях изобретения за фильтрованием вируса следует стадия ультрафильтрации/диафильтрации.

В некоторых воплощениях изобретения предложены способы изготовления антигенных композиций, описанных в настоящем документе в другом месте, включающие культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, кодирующий рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV для экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, и выполнение процесса очистки экспрессированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, включающего стадии: (а) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV в среду, содержащую декстрансульфат, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 30–60 мМ фосфата натрия при pH 6,0–8,0; (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из среды с использованием буферного раствора, содержащего 10–30 мМ фосфата натрия, 200–270 мМ хлорида натрия, pH 6,0–8,0; (в) добавление полисорбата-80 в жидкую среду, содержащую рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV до концентрации 0,5–2,5% и инкубация указанной жидкой среды в течение 10–25 часов при температуре 15–25°C; (г) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на смолу, содержащую лиганд, несущий четвертичную аминную группу, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 10–30 мМ фосфата и 40–120 мМ хлорида натрия, pH 6,0–8,0; (д) элюирование рекомбинантного растворимого

полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего 10–30 мМ фосфата натрия, 130–230 мМ хлорида натрия; pH 6,0–8,0; и (е) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на связанный с лигандом субстрат, содержащий N-бензил-N-метилэтанолламин в буферном растворе для внесения, содержащем 10–30 мМ, например в диапазоне 15–25 мМ, 16–24 мМ, 17–23 мМ, 18–22 мМ, 19–21 мМ фосфата натрия; 100–300 мМ, например, в диапазоне 120–250 мМ, 140–225 мМ, 160–200 мМ, 170–190 мМ хлорида натрия; pH в диапазоне 7,0–8,0, например, 7,1–7,9, 7,2–7,8, или 7,3–7,7; и (ж) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из субстрата с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего (i) 150–350 мМ, например, в диапазоне 200–300 мМ, 225–275 мМ, 230–270 мМ, 235–265 мМ, 240–260 мМ или 245–255 мМ цитрата натрия; (ii) 200–400 мМ, например, в диапазоне 250–350 мМ, 275–325 мМ, 280–320 мМ, в диапазоне 285–315 мМ, 290–310 мМ или 295–305 мМ аргинина; и (iii) 10–30 мМ, например 15–25 мМ, 16–24 мМ, 17–23 мМ, 18–22 мМ, 19–21 мМ фосфата натрия; pH в диапазоне 6,9–7,9, например, 7,0–7,8, 7,1–7,7 или 7,2–7,6. В некоторых воплощениях изобретения за очисткой мультимодальной жидкостной хроматографией следует фильтрование вируса. В некоторых воплощениях изобретения за фильтрованием вируса следует стадия ультрафильтрации/диафильтрации.

В некоторых воплощениях изобретения предложены способы изготовления антигенных композиций, описанных в настоящем документе в другом месте, включающие культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, кодирующий растворимый полипептид белка F RSV для экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, и выполнение процесса очистки экспрессированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, включающего в себя стадии: (а) добавление полисорбата-80 в жидкую среду и доведение концентрации до 1,0% и инкубация указанной жидкой среды в течение 15–20 часов при контролируемой комнатной температуре; (б) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV в среду Capto DeVirS, содержащую декстрансульфат, где смолу уравнивают 47 мМ фосфата натрия, pH 7,0–7,4; (в) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из среды с использованием буферного раствора, содержащего 20 мМ фосфата натрия, 235 мМ хлорида натрия; pH 7,0–7,4; (г) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на смолу, содержащую связанный с лигандом Capto Q ImpRes субстрат, содержащий четвертичную аминную группу, где смолу уравнивают буферным раствором,

содержащим 20 мМ фосфата натрия, 115 мМ хлорида натрия; pH 7,0–7,4; (д) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего 20 мМ фосфата натрия, 225 мМ хлорида натрия, pH 7,0–7,4; (е) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на связанный с лигандом *Capto Adhere* субстрат, содержащий N-бензил-N-метилэтаноламин, в буферном растворе для внесения, содержащем 20 мМ фосфата натрия; 225 мМ хлорида натрия; pH 7,0–7,4; и (ж) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из субстрата с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего (i) 250 мМ цитрата натрия; (ii) 300 мМ аргинина; и (iii) 20 мМ фосфата натрия; pH 7,0–7,4. В некоторых воплощениях изобретения за очисткой мультимодальной жидкостной хроматографией с использованием связанного с лигандом субстрата, содержащего N-бензил-N-метилэтаноламин, следует фильтрование вируса, включающее в себя дополнительные стадии предварительного фильтрования на мембране 0,1 мкм и фильтрования на мембране 19 нм. В некоторых воплощениях изобретения за фильтрованием вируса следует стадия ультрафильтрации/диафильтрации, на которой используют мембрану с порогом отсечения молекулярной массы 50 кДа и буферный раствор для диафильтрации, содержащий 10 мМ фосфата калия, 5% трегалозы. В некоторых воплощениях изобретения за стадией ультрафильтрации/диафильтрации следует стадия добавления полисорбата 80 до концентрации 0,05%. В некоторых воплощениях изобретения за стадией добавления полисорбата 80 следует стадия фильтрования с использованием фильтра, имеющего порог отсечения примерно 0,2 мкм или менее.

В некоторых воплощениях изобретения предложены способы изготовления антигенных композиций, описанных в настоящем документе в другом месте, включающие культивирование клеток-хозяев, содержащих вектор, кодирующий рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV для экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, и выполнение процесса очистки экспрессированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, включающего в себя стадии: (а) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV в среду *Capto DeVirS*, содержащую декстрансульфат, где смолу уравнивают 40 мМ фосфата натрия, pH 7,1–7,5; (б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из среды с использованием буферного раствора, содержащего 20 мМ фосфата натрия, 240 мМ хлорида натрия, при

pH 7,2-7,6; (в) добавление полисорбата-80 в жидкую среду и доведение концентрации до 2,0% и инкубация указанной жидкой среды в течение 18–24 часов при контролируемой комнатной температуре; (г) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на смолу, содержащую связанный с лигандом Capto Q ImpRes субстрат, содержащий четвертичную аминную группу, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим 20 mM фосфата натрия, 80 mM хлорида натрия; pH 7,3–7,7; (д) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего 20 mM фосфата натрия, 180 mM хлорида натрия; pH 7,3–7,7; (е) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на связанный с лигандом Capto Adhere субстрат, содержащий N-бензил-N-метилэтаноламин, в буферном растворе для внесения, содержащем 20 mM фосфата натрия; 180 mM хлорида натрия; pH 7,3–7,7; и (ж) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из субстрата с использованием буферного раствора для элюирования, содержащего (i) 250 mM цитрата натрия; (ii) 300 mM аргинина; и (iii) 20 mM фосфата натрия; pH 7,2–7,6.

В некоторых воплощениях изобретения за очисткой мультимодальной жидкостной хроматографией с использованием связанного с лигандом субстрата, содержащего N-бензил-N-метилэтаноламин, следует фильтрование вируса, включающее в себя дополнительные стадии предварительного фильтрования на мембране 0,1 мкм и фильтрования на мембране 19 нм. В некоторых воплощениях изобретения за очисткой мультимодальной жидкостной хроматографией с использованием связанного с лигандом субстрата, содержащего N-бензил-N-метилэтаноламин, следует фильтрование вируса, включающее в себя дополнительные стадии предварительного фильтрования на мембране 0,1 мкм и фильтрования на мембране 20 нм. В некоторых воплощениях изобретения за фильтрованием вируса следует стадия ультрафильтрации/диафильтрации, на которой используют мембрану с порогом отсечения молекулярной массы 50 кДа и буферный раствор для диафильтрации, содержащий 10 mM фосфата калия, 4% трегалозы. В некоторых воплощениях изобретения за стадией ультрафильтрации/диафильтрации следует стадия добавления полисорбата 80 до концентрации 0,05%. В некоторых воплощениях изобретения за стадией добавления полисорбата 80 следует стадия фильтрования с использованием фильтра, имеющего порог отсечения примерно 0,2 мкм или менее.

В некоторых воплощениях изобретения за описанными выше способами следует стадия лиофилизации рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV. Способы лиофилизации рекомбинантных белков известны, см., например, Hsu et al. (1992) “Determining the optimum residual moisture in lyophilized protein pharmaceuticals,” *Developments in Biological Standardization* 74: 255–70; Costantine et al. (1998) “Effect of excipients on the stability and structure of lyophilized recombinant human growth hormone,” *J. Pharm. Sci.* 87: 1412–1420.

В некоторых воплощениях изобретения предложен способ разделения описанной выше совокупности тримеров на совокупность тримеров, в которой большинство тримеров содержит по меньшей мере один F' протомер, и совокупности тримеров на совокупности тримеров, в которой большинство тримеров содержит 3 F-протомер, где указанный способ включает стадию хроматографии Capto MMC ImpRes. В некоторых воплощениях изобретения на стадии хроматографии Capto MMC ImpRes используют градиент NaCl от 0 до 250 мМ, 20 мМ фосфата натрия, 1 М цитрата натрия. В некоторых воплощениях изобретения градиент хлорида натрия проводят в 20 объемах колонки.

В некоторых воплощениях изобретения предложен способ разделения совокупности тримеров, как описано выше, на совокупность тримеров, содержащую по меньшей мере один F' протомер, и совокупности тримеров, содержащую 3 F-протомера, где указанный способ включает стадию жидкостной катионообменной хроматографии со слабыми катионами. В некоторых воплощениях изобретения на стадии катионообменной хроматографии со слабыми катионами для элюирования совокупностей тримеров используют градиент хлорида натрия от 0 мМ NaCl до 400 мМ NaCl. В некоторых воплощениях изобретения градиент хлорида натрия применяют в течение 25 минут при скорости потока 1 мл/мин. В некоторых воплощениях изобретения обмен слабых катионов проводят с использованием первой подвижной фазы, содержащей 100 мМ одноосновного фосфата натрия, второй подвижной фазы, содержащей 100 мМ двухосновного фосфата натрия, третьей подвижной фазы, содержащей 1 М хлорида натрия, и четвертой подвижной фазы, состоящей из воды. Эти способы можно целесообразно выполнять на имеющихся в продаже средах и инструментах, таких как колонка ProPac WCX-10 производства компании ThermoFisher (доступна в Интернете на сайте assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/br-21689-propac-wcx-tips-tricks-br21689-en.pdf), используя хроматограф Waters Acquity UPLC и следуя инструкциям производителя.

ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ

Также предложены иммуногенные композиции, включающие в себя антигенные композиции, содержащие рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. Фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты хорошо известны и могут быть выбраны специалистами в данной области техники. Например, носитель или эксципиент может целесообразно включать буферный раствор. Возможно носитель или эксципиент также содержит по меньшей мере один компонент, который стабилизирует растворимость и/или придает стабильность. Примеры солюбилизирующих/стабилизирующих агентов включают детергенты, например лаурилсаркозин и/или Твин. Альтернативные солюбилизирующие/стабилизирующие агенты включают аргинин и стеклообразующие полиолы (такие как сахароза, трегалоза и т. п.). Многочисленные фармацевтически приемлемые носители и/или фармацевтически приемлемые эксципиенты известны в данной области техники и описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 5th Edition (975).

Соответственно, подходящие эксципиенты и носители могут быть выбраны специалистами в данной области техники для получения препарата, подходящего для доставки субъекту выбранным путем введения. Подходящие эксципиенты включают без ограничения: глицерин, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сорбит, трегалозу, N-лауроилсаркозина натриевую соль, L-пролин, не являющийся детергентом сульфобетаин, гуанидина гидрохлорид, мочевины, триметиламина оксид, KCl, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ и другие соли с двухвалентными катионами, дитиотриэтол, дитиоэритрит и β-меркаптоэтанол. Другие эксципиенты могут представлять собой детергенты (включая: Твин 80, Твин 20, Тритон X-100, NP-40, Empigen BB, октилглюкозид, лауроилмальтозид, Zwittergent 3-08, Zwittergent 3-0, Zwittergent 3-2, Zwittergent 3-4, Zwittergent 3-6, 3-((3-холамидопропил)-диметиламмоний)-1-пропансульфонат (CHAPS), деоксихолат натрия, додецилсульфат натрия, цетилтриметиламмония бромид). В некоторых воплощениях изобретения иммуногенная композиция содержит рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, 10 мМ фосфата калия, 5% трегалозу, 0,05% полисорбат 80 при pH 7,0. В некоторых воплощениях изобретения иммуногенная композиция содержит рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, 10 мМ фосфата калия, 4% трегалозу, 0,05% полисорбат 80 при pH 6,8.

Как упоминалось в настоящем документе в другом месте, к рекомбинантному растворимому полипептиду белка F RSV можно применять стадию лиофилизации. Таким образом, в некоторых воплощениях изобретения предложены лиофилизированные иммуногенные композиции.

Возможно иммуногенные композиции также включают в себя адъювант. В контексте иммуногенной композиции, подходящей для введения субъекту с целью вызывания защитного иммунного ответа против RSV адъювант выбран так, чтобы вызывать односторонний Th1-иммунный ответ.

Как правило, адъювант выбран так, чтобы усиливать односторонний Th1-иммунный ответ у субъекта или в популяции субъектов, которым вводят композицию. Например, если иммуногенная композиция предназначена для введения субъекту конкретной возрастной группы, подверженного (или обладающего повышенным риском) инфекции RSV, адъювант выбран так, чтобы он был безопасным и эффективным у субъекта или в популяции субъектов. Таким образом, при приготовлении препарата иммуногенной композиции, содержащей композицию растворимого полипептида белка F RSV для введения взрослому субъекту пожилого возраста (например, субъекту в возрасте по меньшей мере 50 лет), адъювант выбран так, чтобы он был безопасным и эффективным у взрослых субъектов пожилого возраста. Аналогично, если иммуногенная композиция предназначена для введения субъекту, представляющему собой новорожденного или младенца (например, субъекту от рождения до двухлетнего возраста), адъювант выбран так, чтобы он был безопасным и эффективным у новорожденных и младенцев.

Дополнительно адъювант, как правило, выбран так, чтобы усиливать Th1 иммунный ответ при введении таким же путем, которым вводят иммуногенную композицию. Например, при приготовлении препарата иммуногенной композиции для назального введения целесообразными адъювантами, усиливающими односторонний ответ Th1, являются протеосомы и протоллин. Напротив, если препарат иммуногенной композиции готовят для внутримышечного введения, целесообразно выбирать адъюванты, включающие один или более агонистов TLR 4 (например, 3D-MPL), сапонины (например, QS21), липосомы и/или масляные и водные эмульсии. Адъювант можно включать в препарат отдельно от иммуногенной композиции, хотя для удобства их, как правило, включают в препарат вместе.

При приготовлении отдельного от иммуногенной композиции препарата адъюванта в виде жидкости, а иммуногенной композиции в лиофилизированном виде

жидкий адъювант можно использовать для восстановления лиофилизированной иммуногенной композиции. В некоторых воплощениях изобретения предложены способы, включающие стадию восстановления иммуногенной композиции, содержащей рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV в жидком адъюванте.

Представляющий интерес адъювант содержит агонист TLR4 и сапонин в липосомном препарате.

Подходящим примером агониста TLR4 является липополисахарид, предпочтительно нетоксичное производное липида А, в частности монофосфориллипид А, и более конкретно 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3D-MPL).

3D-MPL продается под названием «MPL» компанией GlaxoSmithKline Biologicals N.A. и обозначен во всем тексте документа как 3D-MPL. См., например, патенты US №№ 4436727; 4877611; 4866034 и 4912094. 3D-MPL может быть получен в соответствии со способами, описанными в GB 2220211 А. Химически он представляет собой смесь 3-деацилированного монофосфориллипида А с 4, 5 или 6 ацилированными цепями. В контексте настоящего изобретения состоящий из мелких частиц 3D-MPL можно использовать для приготовления композиции адъюванта в водном растворе. Состоящий из мелких частиц 3D-MPL имеет такой размер частиц, что его можно стерилизовать фильтрованием через фильтр 0,22 мкм. Такие препараты описаны в WO94/21292.

Другими агонистами TLR4, которые можно использовать, являются алкилглюкозаминидфосфаты (AGP), такие как описаны в WO98/50399 или в патенте US № 6303347 (также описаны способы получения AGP). Некоторые AGP являются агонистами TLR4, а некоторые являются антагонистами TLR4.

Другие агонисты TLR4, которые могут иметь применение в описанных в настоящем документе иммуногенных композициях, включают глюкопиранозиллипидный адъювант (GLA), такой как описан в WO2008/153541 или WO2009/143457, либо в научных статьях Coler RN et al. (2011) Development and Characterization of Synthetic Glucopyranosyl Lipid Adjuvant System as a Vaccine Adjuvant. PLoS ONE 6(1): e16333. doi:10.1371/journal.pone.0016333 и Arias MA et al. (2012) Glucopyranosyl Lipid Adjuvant (GLA), a Synthetic TLR4 Agonist, Promotes Potent Systemic and Mucosal Responses to Intranasal Immunization with HIVgp140. PLoS ONE 7(7): e41144. doi:10.1371/journal.pone.0041144. WO2008/153541 или WO2009/143457

включены в настоящий документ посредством ссылки с целью определения агонистов TLR4, которые могут иметь применение в настоящем изобретении.

Как правило, агонист TLR4, такой как липополисахарид и в частности 3D-MPL, является чистым по меньшей мере на 90%, например чистым по меньшей мере на 95%, в частности чистым по меньшей мере на 98%, в частности чистым на 99%.

Подходящим сапонином для использования в настоящем изобретении является Quil A и его производные. Quil A представляет собой препарат сапонины, выделенного из южноамериканского дерева *Quillaja saponaria* Molina, и его адьювантная активность была впервые описана Dalsgaard *et al.* в 1974 г. ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254). Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) были выделены очищенные фракции Quil A, которые сохраняют адьювантную активность при отсутствии токсичности, связанной с Quil A (см., например, EP0362278). Представляющие общий интерес фракции включают QS7, QS17, QS18 и QS-21, например QS7 и QS-21 (также известные как QA7 и QA21). Сапонином, представляющим особый интерес, является QS-21.

Как правило, сапонин, такой как Quil A и в частности QS-21, является чистым по меньшей мере на 90%, например чистым по меньшей мере на 95%, в частности чистым по меньшей мере на 98%, в частности чистым на 99%.

Полезный признак заключается в том, что сапонин присутствует в менее реактогенной композиции, где он гасится экзогенным стеринем, таким как холестерин. Целесообразно отношение сапонин: стерин (например, QS21: холестерин) составляет от 1: 100 до 1: 1 масс./масс., например от 1: 10 до 1: 1 масс./масс., например от 1: 5 до 1: 1 масс./масс..

Размер липосом может изменяться от 30 нм до нескольких мкм в зависимости от композиции фосфолипидов и способа, используемого для их получения.

Липосомы могут быть образованы из множества различных липидов, хотя желательно, чтобы они содержали диолеилфосфатидилхолин (DOPC) или состояли по существу из DOPC и стерина (с сапонином и агонистом LTR4 по мере целесообразности).

В настоящем изобретении размер липосом будет находиться в диапазоне от 50 нм до 200 нм, в частности от 60 нм до 180 нм, например 70–165 нм. Оптимально для возможности стерилизации путем фильтрования липосомы должны быть стабильными и иметь диаметр примерно 100 нм.

Структурную целостность липосом можно оценивать такими способами, как измерение размера и полидисперсности липосом методом динамического светорассеяния (ДСР) (Z -средний диаметр, Z_{av}) или методом электронной микроскопии для анализа структуры липосом. В одном воплощении изобретения средний размер частицы находится в диапазоне от 95 до 120 нм и/или индекс полидисперсности (PdI) составляет не более 0,35, в частности не более 0,3, например не более 0,2.

Возможно адьювант может также включать минеральные соли, такие как соли алюминия или кальция, в частности гидроксид алюминия, фосфат алюминия и фосфат кальция. Например, адьювант, содержащий 3D-MPL в комбинации с солью алюминия (например, с гидроксидом алюминия или «квасцами») подходит для приготовления препарата иммуногенной композиции для введения субъекту-человеку.

В композициях с растворимым полипептидом белка F RSV можно также использовать комбинации различных адьювантов, таких как упомянутые в настоящем документе выше. Например, как уже отмечено, QS21 можно включать в препарат вместе с 3D-MPL. Отношение QS21: 3D-MPL, как правило, будет составлять порядка от 1: 10 до 10: 1; например от 1: 5 до 5: 1, и часто по существу 1: 1. Как правило, отношение находится в диапазоне от 2,5: 1 до 1: 1 3D-MPL: QS21. Другой комбинированный препарат адьюванта включает 3D-MPL и соль алюминия, например гидроксид алюминия. При приготовлении в виде комбинации такая комбинация может усиливать антигенспецифичный иммунный ответ Th1.

В некоторых случаях препарат адьюванта включает эмульсию масло-в-воде или минеральную соль, такую как соль кальция или алюминия, например фосфат кальция, фосфат алюминия или гидроксид алюминия.

Один из примеров эмульсии масло-в-воде содержит метаболизируемое масло, такое как сквален, токол, такой как токоферол, например альфа-токоферол, и поверхностно-активное вещество (ПАВ), такое как полисорбат 80 или Твин 80, в водном носителе. Водным носителем может быть, например, фосфатно-солевой буферный раствор. Дополнительно эмульсия масло-в-воде может содержать Спан 85 и/или лецитин и/или трикаприлин.

При наличии квасцов, например, в комбинации с 3D-MPL, их количество, как правило, составляет от примерно 100 мкг до 1 мг, например от примерно 100 мкг или примерно 200 мкг до примерно 750 мкг, например, примерно 500 мкг на дозу.

Значение рН жидкого препарата регулируют в зависимости от компонентов композиции и необходимой пригодности для введения субъекту. Целесообразно рН жидкой смеси составляет по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 5,5, по меньшей мере 5,8, по меньшей мере 6. Значение рН жидкой смеси может быть менее 9, менее 8, менее 7,5 или менее 7. В других воплощениях изобретения рН жидкой смеси находится в диапазоне от 4 до 9, от 5 до 8, например от 5,5 до 8. Следовательно, целесообразно рН будет составлять 6–9, например 6,5–8,5. В особенно предпочтительном воплощении изобретения рН составляет от 5,8 до 6,4.

Соответствующий буферный раствор может быть выбран из ацетата, цитрата, гистидина, малеата, фосфата, сукцината, тартрата и Трис. В одном воплощении изобретения буферный раствор представляет собой фосфатный буферный раствор, такой как $\text{Na}/\text{Na}_2\text{PO}_4$, $\text{Na}/\text{K}_2\text{PO}_4$ или $\text{K}/\text{K}_2\text{PO}_4$.

Буферный раствор может присутствовать в жидкой смеси в количестве 6 мМ, по меньшей мере 10 мМ или по меньшей мере 40 мМ. Буферный раствор может присутствовать в жидкой смеси в количестве менее 100 мМ, менее 60 мМ или менее 40 мМ.

Хорошо известно, что во избежание повреждения или лизиса клеток растворы для парентерального введения должны иметь фармацевтически приемлемую осмоляльность. Фармацевтически приемлемая осмоляльность в целом означает, что растворы будут иметь осмоляльность, которая является по существу изотонической или незначительно гипертонической. Целесообразно, чтобы композиции по настоящему изобретению после восстановления имели осмоляльность в диапазоне от 250 до 750 мОсм/кг, например, осмоляльность может находиться в диапазоне от 250 до 550 мОсм/кг, например в диапазоне от 280 до 500 мОсм/кг. В особенно предпочтительном воплощении изобретения осмоляльность может находиться в диапазоне от 280 до 310 мОсм/кг.

Осмоляльность можно измерять в соответствии с известными в данной области техники методиками, например, с использованием имеющегося в продаже осмометра, например, модели Advanced® 2020, имеющегося в продаже от компании Advanced Instruments Inc. (США).

«Агент, придающий изотоничность» представляет собой соединение, которое переносится физиологически и придает препарату подходящую тоничность для предотвращения чистого потока воды через клеточные мембраны, находящиеся в контакте с препаратом. В некоторых воплощениях изобретения агент, придающий

изотоничность, используемый для композиции, представляет собой соль (или смеси солей), для удобства соль представляет собой хлорид натрия, целесообразно в концентрации приблизительно 150 мМ. Тем не менее в других воплощениях изобретения композиция содержит неионный агент, придающий изотоничность, и концентрация хлорида натрия в композиции составляет менее 100 мМ, например, менее 80 мМ, например, менее 50 мМ, например, менее 40 мМ, менее 30 мМ и в частности менее 20 мМ. Ионная сила в композиции может составлять менее 100 мМ, например, менее 80 мМ, например, менее 50 мМ, например, менее 40 мМ или менее 30 мМ.

В конкретном воплощении изобретения неионный агент, придающий изотоничность, представляет собой полиол, такой как сахароза и/или сорбит. Концентрация сорбита может находиться в диапазоне, например, от примерно 3% до примерно 15% (масс./об.), например, от примерно 4% до примерно 10% (масс./об.). Адьюванты, содержащие иммунологически активную фракцию сапонина и агонист TLR4, где придающий изотоничность агент представляет собой соль или полиол, описаны в WO2012/080369.

Целесообразно объем допустимой для человека дозы находится в диапазоне от 0,05 мл до 1 мл, например, от 0,1 до 0,5 мл, в частности объем дозы примерно 0,5 мл или 0,7 мл. Используемые объемы композиций могут зависеть от пути и положения доставки, при этом внутривенным путем вводят меньшие дозы. Однодозовый контейнер может содержать избыток для правильного обращения с материалом при введении однократной дозы.

Сапонин, такой как QS-21, можно применять в количествах от 1 до 100 мкг на дозу для медицинского применения. QS-21 можно использовать в количестве примерно 50 мкг. Примеры подходящих диапазонов составляют 40–60 мкг, целесообразно 45–55 мкг или 49–51 мкг, например 50 мкг. В следующем воплощении изобретения доза для медицинского применения содержит QS-21 в количестве примерно 25 мкг. Примеры более низких диапазонов включают 20–30 мкг, целесообразно 22–28 мкг или 24–26 мкг, например 25 мкг. Допустимые для человека дозы, предназначенные для детей или младенцев, могут быть снижены по сравнению с дозами для взрослых (например, снижение на 50%).

Агонист TLR4, такой как липополисахарид, например 3D-MPL, можно применять в количествах от 1 до 100 мкг на допустимую для человека дозу. 3D-MPL можно использовать в количестве примерно 50 мкг. Примеры подходящих диапазонов составляют 40–60 мкг, целесообразно 45–55 мкг или 49–51 мкг, например 50 мкг. В

следующем воплощении изобретения допустимая для человека доза содержит 3D-MPL в концентрации примерно 25 мкг. Примеры более низких диапазонов включают 20–30 мкг, целесообразно 22–28 мкг или 24–26 мкг, например 25 мкг. Допустимые для человека дозы, предназначенные для детей или младенцев, могут быть снижены по сравнению с дозами для взрослых (например, снижение на 50%).

Если в адъюванте присутствуют и агонист TLR4, и сапонин, отношение агониста TLR4 к сапонины по массе целесообразно составляет от 1: 5 до 5: 1, целесообразно 1: 1. Например, если 3D-MPL присутствует в количестве 50 мкг или 25 мкг, целесообразно QS-21 может также присутствовать в количестве 50 мкг или 25 мкг на допустимую для человека дозу.

Отношение сапонин: DOPC, как правило, будет составлять порядка от 1: 50 до 1: 10 (масс./масс.), целесообразно в диапазоне от 1: 25 до 1: 15 (масс./масс.) и предпочтительно от 1: 22 до 1: 18 (масс./масс.), например 1: 20 (масс./масс.).

Иммуногенная композиция, как правило, содержит иммунопротективное количество (или его дробную дозу) антигена и может быть получена традиционными методами. Получение иммуногенных композиций, в том числе для введения субъекту-человеку, в общих чертах описано в *Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 61 Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach*, edited by Powell and Newman, Plenum Press, 1995. *New Trends and Developments in Vaccines*, edited by Voller *et al.*, University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978. Инкапсуляция в липосомы описана, например, Fullerton, патент U.S. 4235877. Конъюгация белков с макромолекулами описана, например, Likhite, патент U.S. 4372945 и Armor *et al.*, патент U.S. 4474757.

Как правило, количество белка в каждой дозе иммуногенной композиции выбрано так, что это количество индуцирует иммунопротективный ответ без значимых нежелательных побочных эффектов у типичного субъекта. «Иммунопротективный» в данном контексте необязательно означает полную защиту от инфекции; он означает защиту от симптомов или заболевания, в частности тяжелого заболевания, обусловленного вирусом. Количество антигена может изменяться в зависимости от конкретного используемого иммуногена. По существу ожидается, что каждая допустимая для человека доза будет содержать 1–1000 мкг белка, например от примерно 1 мкг до примерно 100 мкг, например от примерно 1 мкг до примерно 50 мкг, например, примерно 1 мкг, примерно 2 мкг, примерно 5 мкг, примерно 10 мкг, примерно 15 мкг, примерно 20 мкг, примерно 25 мкг, примерно 30 мкг, примерно 40 мкг или примерно 50 мкг. Количество, используемое в иммуногенной композиции,

выбрано в зависимости от рассматриваемой популяции, например младенцы, матери (матери, еще не родившие ребенка) или пожилые. Оптимальное количество для конкретной композиции может быть установлено на основании стандартных исследований, включающих наблюдение за титрами антител и другими ответами у субъектов. После первоначальной вакцинации субъекты могут получать бустер-иммунизацию в течение примерно 4 недель.

Следует отметить, что независимо от выбранного адъюванта концентрацию в готовом препарате рассчитывают так, чтобы она была безопасной и эффективной для целевой популяции. Например, иммуногенные композиции для вызывания иммунного ответа против RSV у человека целесообразно вводить младенцам (например, младенцам с рождения и до 1 года, например, от 0 до 6 месяцев, в возрасте для введения начальной дозы) или индивидам из популяции матерей. Например, иммуногенные композиции для вызывания иммунного ответа против RSV также целесообразно вводить взрослым пожилого возраста. Должно быть понятно, что в этих различных областях применения выбор адъюванта может различаться, и специалисты в данной области техники могут определять оптимальный адъювант и его концентрацию для каждой ситуации.

В некоторых воплощениях изобретения иммуногенные композиции представляют собой вакцины, которые уменьшают или предотвращают инфекцию RSV. В некоторых воплощениях изобретения иммуногенные композиции представляют собой вакцины, которые уменьшают или предотвращают патологический ответ после инфекции RSV. Возможно, препараты иммуногенных композиций, содержащих растворимый полипептид белка F RSV, изготовлены с по меньшей мере одним дополнительным антигеном патогенного организма, отличающегося от RSV. Например, патогенный организм может представлять собой патоген дыхательных путей (такой как вирус или бактерия, которые вызывают инфекцию дыхательных путей). В некоторых случаях иммуногенная композиция содержит антиген, полученный из патогенного вируса, отличающегося от RSV, такого как вирус, который вызывает инфекцию дыхательных путей, такой как вирус гриппа или парагриппа. В других воплощениях изобретения дополнительные антигены выбраны так, чтобы облегчить введение или уменьшить количество инокуляций, необходимое для защиты субъекта против множества инфекционных организмов. Например, антиген может быть получен среди прочего из одного или более возбудителей гриппа, гепатита В,

дифтерии, столбняка, коклюша, *Neisseria meningitidis*, полиовируса, стрептококка или пневмококка.

Соответственно, применение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV в получении лекарственного средства для лечения (либо терапевтического после, либо профилактического до) воздействия или инфекции, вызванной вирусом RSV, также составляет признак описания данного изобретения. Таким же образом, признаком описания данного изобретения являются способы вызывания иммунного ответа против RSV. Такие способы включают введение субъекту, такому как субъект-человек, иммунологически эффективного количества антигенной композиции, содержащей растворимый полипептид белка F RSV. Композиция часто включает в себя адъювант, который вызывает односторонний Th1 иммунный ответ. Композицию готовят так, чтобы вызывать иммунный ответ, специфичный для RSV, не вызывая усиления вирусного заболевания после контакта с RSV. То есть, композицию готовят так, чтобы получить в результате односторонний Th1 иммунный ответ, который уменьшает или предотвращает инфекцию RSV и/или уменьшает или предотвращает патологический ответ после инфекции RSV. Хотя композицию можно вводить множеством различных путей, чаще всего иммуногенные композиции доставляют внутримышечным или интраназальным путем введения.

Иммуногенная композиция, как правило, содержит иммунопротективное количество антигена (или его дробную дозу) и может быть получена традиционными методами. Получение иммуногенных композиций, в том числе для введения субъекту-человеку, в общих чертах описано в *Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 61 Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach*, edited by Powell and Newman, Plenum Press, 1995. *New Trends and Developments in Vaccines*, edited by Voller *et al.*, University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978. Инкапсуляция в липосомы описана, например, Fullerton, патент U.S. 4235877. Конъюгация белков с макромолекулами описана, например, Likhite, патент U.S. 4372945 и Armor *et al.*, патент U.S. 4474757.

Как правило, количество белка в каждой дозе иммуногенной композиции выбрано так, что это количество индуцирует иммунопротективный ответ без значимых нежелательных побочных эффектов у типичного субъекта. «Иммунопротективный» в данном контексте необязательно означает полную защиту от инфекции; он означает защиту от симптомов или заболевания, в частности тяжелого заболевания, обусловленного вирусом. Количество антигена может изменяться в зависимости от конкретного используемого иммуногена. По существу ожидается, что каждая

допустимая для человека доза будет содержать 1–1000 мкг белка, например от примерно 1 мкг до примерно 100 мкг, например от примерно 1 мкг до примерно 50 мкг, например, примерно 1 мкг, примерно 2 мкг, примерно 5 мкг, примерно 10 мкг, примерно 15 мкг, примерно 20 мкг, примерно 25 мкг, примерно 30 мкг, примерно 40 мкг или примерно 50 мкг. Количество, используемое в иммуногенной композиции, выбрано в зависимости от рассматриваемой популяции (например, младенцы, матери или пожилые). Оптимальное количество для конкретной композиции может быть установлено на основании стандартных исследований, включающих наблюдение за титрами антител и другими ответами у субъектов. После первоначальной вакцинации субъекты могут получать бустер-иммунизацию в течение примерно 4–12 недель. Например, при введении иммуногенной композиции, содержащей растворимый полипептид белка F RSV, начальный и последующие инокуляты можно вводить одновременно с другими вакцинами, которые вводят в этот период.

Воплощения изобретения, часть А

1. Антигенная композиция, содержащая рекомбинантный растворимый полипептид белка F респираторно-синцитиального вируса (RSV), содержащий замены S155C, S290C, S190F и V207L, где указанная композиция содержит более 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% масс./масс. рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV по сравнению с белком клетки-хозяина.

2. Антигенная композиция, содержащая рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, содержащий замены S155C, S290C, S190F и V207L, где указанная композиция содержит менее 0,19%, 0,18%, 0,17%, 0,16%, 0,15%, 0,14%, 0,13%, 0,12%, 0,11%, 0,10%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,019%, 0,018%, 0,017%, 0,016%, 0,015%, 0,014% или 0,013% масс./масс. белка GRP78 клетки-хозяина по сравнению с рекомбинантным растворимым полипептидом белка F RSV.

3. Антигенная композиция, содержащая рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, содержащий замены S155C, S290C, S190F и V207L, где указанная композиция содержит более 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96% масс./масс. неагрегированного тримера по сравнению с агрегированным тримером.

4. Антигенная композиция, содержащая рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, содержащий замены S155C, S290C, S190F и V207L, где

указанный растворимый полипептид белка F представляет собой гликозилированный растворимый полипептид белка F, и где указанный гликозилированный растворимый полипептид белка F имеет молекулярную массу более 59,5 кДа, например, более 60,0 кДа, более 60,5 кДа или более 61,0 кДа, включая гликозилирование.

5. Антигенная композиция, содержащая рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, содержащий замены S155C, S290C, S190F и V207L, где указанный растворимый полипептид белка F имеет pI

(а) менее 7,8, 7,7, 7,6, 7,5, 7,4, 7,3, 7,2, 7,1, 7,0, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0, 5,9, 5,8, 5,7, 5,4; или

(б) в диапазоне 7,8–5,3, 7,4–5,3, 7,0–5,3, 6,8–5,3, 6,6–5,3, 6,4–5,3, 6,2–5,3, 6,0–5,3.

6. Антигенная композиция, содержащая рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, содержащий замены S155C, S290C, S190F и V207L, где указанный растворимый полипептид белка F содержит гликановые группы, где по меньшей мере примерно 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% или 75% указанных гликановых групп сиалированы, как определено методом профилирования гликанов с использованием ГЖХ-FLR/МС.

7. Антигенная композиция воплощений 1–2 и 4–6 части А, дополнительно содержащая тример указанных рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV.

8. Антигенная композиция воплощений 1–7 части А, где указанный растворимый полипептид белка F содержит цепь F1 и цепь F2.

9. Антигенная композиция воплощений 1–8 части А, где указанная цепь F1 содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95%-й идентичностью с SEQ ID NO:2.

10. Антигенная композиция воплощений 1–9 части А, где указанная цепь F2 содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95%-й идентичностью с SEQ ID NO:3.

11. Антигенная композиция воплощений 1–10 части А, где указанная цепь F1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, а указанная цепь F2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.

Воплощения изобретения, часть В

1. Антигенная композиция, содержащая совокупность тримеров рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV,

где каждый тример указанной совокупности состоит из трех рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV, независимо выбранных из группы, состоящей из:

(а) рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, содержащего цепь F1, имеющую замены S155C, S290C, S190F и V207L («F протомер»); и

(б) рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, содержащего цепь F1, имеющую замены S155C, S290C, S190F и V207L, дополнительно содержащую по меньшей мере 10 аминокислот пептида p27 («F' протомер»);

и описывается формулой

$$nF + (3-n)F' \quad (\text{Формула I}),$$

где n представляет собой целое число от 0 до 3, F представляет собой F-протомер, а F' представляет собой F'-протомер.

2А. Антигенная композиция, содержащая совокупность тримеров рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV,

где каждый тример указанной совокупности состоит из трех рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV, независимо выбранных из группы, состоящей из:

(а) рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, содержащего цепь F1, имеющую замены S155C, S290C, S190F и V207L («F протомер»); и

(б) рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, содержащего цепь F1, имеющую замены S155C, S290C, S190F и V207L, дополнительно содержащую по меньшей мере 10 аминокислот пептида p27 («F' протомер»);

и описывается формулой

$$nF + (3-n)F' \quad (\text{Формула I}),$$

где n представляет собой целое число от 0 до 3, F представляет собой F-протомер, а F' представляет собой F'-протомер;

где по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 20%, 25% рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV в совокупности тримеров представляют собой F' протомеры.

2В. Антигенная композиция любого предшествующего воплощения части В, где F' протомер содержит цепь F1, содержащую нерасщепленный сайт расщепления фурином.

3. Антигенная композиция любого предшествующего воплощения части В, где F'-протомер имеет молекулярную массу на по меньшей мере 1,0 кДа, например по меньшей мере 1,5 кДа, по меньшей мере 2,0 кДа, по меньшей мере 2,5 кДа, по меньшей мере 3,0 кДа больше, чем молекулярная масса F-протомера.

4. Антигенная композиция любого предшествующего воплощения части В, где соотношение тримеров рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV, содержащих по меньшей мере один F'-протомер, и тримеров рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV, не содержащих F'-протомеров, составляет по меньшей мере 1: 1,2; например, по меньшей мере 1: 1,3; по меньшей мере 1: 1,4; по меньшей мере 1: 1,5; по меньшей мере 1: 1,6; по меньшей мере 1: 1,7; по меньшей мере 1: 1,8; по меньшей мере 1: 1,9; по меньшей мере 1: 2,0; по меньшей мере 1: 2,1; по меньшей мере 1: 2,2; по меньшей мере 1: 2,3; по меньшей мере 1: 2,4; по меньшей мере 1: 2,5; по меньшей мере 1: 2,6; по меньшей мере 1: 2,7; по меньшей мере 1: 2,8; по меньшей мере 1: 2,9; по меньшей мере 1: 3,0; по меньшей мере 1: 3,5; по меньшей мере 1: 4; по меньшей мере 1: 9; по меньшей мере 1: 19 или по меньшей мере 1: 29.

5. Антигенная композиция любого предшествующего воплощения части В, где совокупность тримеров рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV можно разделить с помощью хроматографии на первый и второй пики, которые можно обнаружить методом седиментации, при этом указанный первый пик имеет коэффициент седиментации примерно 3,96S, а указанный второй пик имеет коэффициент седиментации примерно 4,13S.

6. Антигенная композиция любого из предшествующих воплощений части А или части В, где цепь F1 содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95%-й идентичностью с SEQ ID NO:2, а указанная цепь F2 содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95%-й идентичностью с SEQ ID NO:3.

7. Антигенная композиция любого предшествующего воплощения части В, где F' протомер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.

8. Антигенная композиция любого предшествующего воплощения части В, где F' протомер содержит цепь F1, имеющую N-концевой пептид p27.

9. Антигенная композиция любого предшествующего воплощения части В, где F' протомер содержит цепь F1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7.

10. Антигенная композиция любого из предшествующих воплощений части В, где протомер F' содержит цепь F1, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95%-й идентичностью с SEQ ID NO:8, а указанная цепь F2 содержит аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95%-й идентичностью с SEQ ID NO:3.

11. Антигенная композиция любого из предшествующих воплощений части В, где

(а) F' протомер содержит цепь F1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и цепь F2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; и

(б) F протомер содержит цепь F1, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95%-й идентичностью с SEQ ID NO:2, и цепь F2, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95%-й идентичностью с SEQ ID NO:3.

12. Антигенная композиция любого из предшествующих воплощений части А или части В, где указанная антигенная композиция лиофилизирована.

13. Иммуногенная композиция, содержащая антигенную композицию по любому из предшествующих воплощений части А или части В и фармацевтически приемлемый носитель или эксипиент.

14. Иммуногенная композиция воплощения 13 части В, где носитель или эксипиент содержит буферный раствор.

15. Иммуногенная композиция воплощения 13–14 части В, дополнительно содержащая адъювант.

16. Иммуногенная композиция воплощения 15 части В, где адъювант вызывает односторонний Th1 иммунный ответ.

17. Иммуногенная композиция воплощения 16 части В, где адъювант включает в себя липосому.

18. Иммуногенная композиция воплощения 16 части В, где адъювант включает в себя эмульсию масло-в-воде.

19. Иммуногенная композиция воплощения 16 части В, где адъювант включает в себя соль алюминия.

20. Иммуногенная композиция любого из воплощений 16–19 части В, где адъювант включает в себя агонист TLR4.

21. Иммуногенная композиция воплощения 20 части В, где адъювант включает в себя липополисахарид.

22. Иммуногенная композиция воплощений 20–21 части В, дополнительно содержащая 3D-MPL.

23. Иммуногенная композиция воплощений 16–22 части В, дополнительно содержащая сапонин.

24. Иммуногенная композиция воплощения 23 части В, где сапонин представляет собой QS21.

25. Иммуногенная композиция воплощения 17 или 18 части В, где адъювант подходит для введения пожилому человеку.

26. Иммуногенная композиция любого из воплощений 13–25 части В, где иммуногенная композиция уменьшает или предотвращает инфекцию RSV.

27. Иммуногенная композиция любого из воплощений 13–26 части В, где иммуногенная композиция уменьшает или предотвращает патологический ответ после инфекции RSV.

28. Иммуногенная композиция любого из воплощений 13–27 части В, дополнительно содержащая по меньшей мере один дополнительный антиген патогенного организма, отличающегося от RSV.

29. Иммуногенная композиция воплощения 28 части В, где по меньшей мере один дополнительный антиген представляет собой антиген вируса, отличающегося от RSV.

30. Иммуногенная композиция воплощения 29 части В, где вирус выбран из группы, состоящей из: вируса гепатита В (HBV), вируса парагриппа (PIV), полиовируса и вируса гриппа.

31. Иммуногенная композиция воплощения 28 части В, где по меньшей мере один дополнительный антиген выбран из группы, состоящей из: дифтерийного антигена, столбнячного антигена, коклюшного антигена, антигенов *Haemophilus influenzae* и пневмококка.

32. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV любого из воплощений 1–11 части А или воплощений 1–12 части В.

33. Рекомбинантная нуклеиновая кислота воплощения 32 части В, где полинуклеотидная последовательность, которая кодирует антиген RSV, оптимизирована по кодонам для экспрессии в выбранной клетке-хозяине.

34. Вектор, содержащий рекомбинантную нуклеиновую кислоту воплощения 32 или 33 части В.

35. Вектор воплощения 34 части В, включающий прокариотический или эукариотический экспрессионный вектор.

36. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту воплощения 32 или 33 или вектор воплощения 34 или 35 части В.

37. Клетка-хозяин воплощения 36 части В, представляющая собой клетку СНО.

38. Клетка-хозяин воплощения 37 части В, где клетка СНО входит в состав клональной популяции.

39. Применение композиции любого из воплощений 1–11 части А или воплощений 1–12 части В или иммуногенной композиции любого из воплощений 13–31 части В в изготовлении лекарственного средства для лечения инфекции RSV.

40. Применение композиции любого из воплощений 1–11 части А или воплощений 1–12 части В или иммуногенной композиции любого из воплощений 13–31 части В в изготовлении лекарственного средства для профилактики инфекции RSV.

41. Способ вызывания иммунного ответа против RSV, включающий: введение субъекту композиции любого из воплощений 1–11 части А или воплощений 1–12 части В или иммуногенной композиции любого из воплощений 13–31 части В.

42. Способ воплощения 41 части В, где введение иммуногенной композиции вызывает иммунный ответ, специфичный для RSV, не вызывая усиления вирусного заболевания после контакта с RSV.

43. Иммуногенная композиция воплощения 41 или 42 части В, где иммунный ответ включает односторонний Th1 иммунный ответ.

44. Способ любого из воплощений 41–43 части В, где иммунный ответ включает защитный иммунный ответ, который уменьшает или предотвращает инфекцию RSV и/или уменьшает или предотвращает патологический ответ после инфекции RSV.

45. Способ любого из воплощений 41–44 части В, где субъект представляет собой субъекта-человека.

46. Способ любого из воплощений 41–45 части В, включающий введение иммуногенной композиции интраназальным путем.

47. Способ любого из воплощений 41–45 части В, включающий введение иммуногенной композиции внутримышечным путем.

48. Композиция любого из воплощений 1–11 части А, воплощений 1–12 части В или иммуногенной композиции любого из воплощений 13–31 части В для применения в медицине.

49. Композиция любого из воплощений 1–11 части А, воплощений 1–12 части В или иммуногенной композиции любого из воплощений 13–31 части В для профилактики или лечения инфекции RSV.

50. Способ изготовления антигенной композиции любого из воплощений 1–11 части А или воплощений 1–12 части В, включающий культивирование клетки-хозяина воплощений 36–38 части В для экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV и процесс очистки экспрессированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, включающий стадию очистки мультимодальной жидкостной хроматографией с использованием связанного с лигандом субстрата, где лиганд может взаимодействовать с белками посредством одного или более из электростатических взаимодействий, образования водородных связей и гидрофобных взаимодействий.

51. Способ воплощения 50 части В, где стадия мультимодальной жидкостной хроматографии включает, во-первых, внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на указанный связанный с лигандом субстрат в присутствии буферного раствора для внесения и, во-вторых, элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из указанного связанного с лигандом субстрата в присутствии буферного раствора для элюирования.

52. Способ воплощения 50–51 части В, где связанный с лигандом субстрат представляет собой мультимодальную анионообменную смолу.

53. Способ воплощения 52 части В, где указанный буферный раствор для элюирования содержит космотропный агент и хаотропный агент.

54. Способ воплощений 50–53 части В, где лиганд содержит N-бензил-N-метилэтаноламин.

55. Способ воплощений 52–54 части В, где космотропный агент выбран из группы, состоящей из: HPO_4 , цитрата, SO_4 , F, OAc, CO_2 , SO_2 , SCN, HPO_2 , Mg, Li, Zn, Al, трет-бутанола, трегалозы, глюкозы, пролина и глутамата.

56. Способ воплощений 52–55 части В, где хаотропный агент выбран из группы, состоящей из: К, Cs, NH₄, (CH₃)₄N, н-бутанола, этанола, гуанидиния хлорида, перхлората, ацетата, хлорида, бромида, йодида, фенола, 2-пропанола, додецилсульфат натрия, тиомочевина, мочевины, аргинина, лизина и гистидина.

57. Способ воплощений 51–56 части В, где буферный раствор для элюирования содержит ионы цитрата и аргинин.

58. Способ воплощений 51–57 части В, где буферный раствор для элюирования содержит:

(а) 150–350 мМ, например, 200–300 мМ, 225–275 мМ, 230–270 мМ, 235–265 мМ, 240–260 мМ или 245–255 мМ цитрата натрия;

(б) 200–400 мМ, например, 250–350 мМ, 275–325 мМ, 280–320 мМ, 285–315 мМ, 290–310 мМ или 295–305 мМ аргинина.

59. Способ воплощения 58 части В, где буферный раствор для элюирования содержит примерно 250 мМ ионов цитрата и примерно 300 мМ аргинина.

60. Способ воплощений 51–59 части В, где буферный раствор для элюирования содержит 10–30 мМ, например, 15–25 мМ, 16–24 мМ, 17–23 мМ, 18–22 мМ или 19–21 мМ фосфата натрия.

61. Способ воплощения 60 части В, где буферный раствор для элюирования содержит примерно 20 мМ фосфата натрия.

62. Способ воплощений 51–61 части В, где буферный раствор для внесения имеет проводимость, выбранную из

(а) диапазона 20–34 мСм/см, например, 21–33 мСм/см, 22–32 мСм/см, 23–31 мСм/см, 24–30 мСм/см, 25–29 мСм/см или 26–28 мСм/см; или

(а) диапазона 11–34 мСм/см, например, 13–31 мСм/см, 15–27 мСм/см, 17–25 мСм/см, 19–23 мСм/см или 20–22 мСм/см.

63. Способ воплощения 62 части В, где буферный раствор для внесения имеет проводимость примерно

(а) 26–28 мСм/см; или

(б) 20–22 мСм/см.

64. Способ воплощений 51–63 части В, где буферный раствор для внесения содержит:

(а) 100–300 мМ, например, в диапазоне 175–275 мМ, 200–250 мМ, 210–240 мМ, 220–230 мМ хлорида натрия;

(б) 100–300 мМ, например, в диапазоне 120–250 мМ, 140–225 мМ, 160–200 мМ, 170–190 мМ хлорида натрия.

65. Способ воплощения 64 части В, где буферный раствор для внесения содержит:

(а) примерно 225 мМ хлорида натрия; или

(б) примерно 180 мМ хлорида натрия.

66. Способ воплощений 51–65 части В, где буферный раствор для внесения и буферный раствор для элюирования независимо имеют рН:

(а) в диапазоне 6,5–7,9, например, 6,6–7,8, 6,7–7,7, 6,8–7,6, 6,9–7,5, 7,0–7,4; или

(б) в диапазоне 6,5–8,0, например, 7,0–7,9, 7,1–7,8, 7,2–7,7.

67. Способ воплощения 66 части В, где буферный раствор для внесения и буферный раствор для элюирования:

(а) каждый имеет рН примерно 7,0–7,4; или

(б) буферный раствор для внесения имеет рН примерно 7,3–7,7, а буферный раствор для элюирования имеет рН примерно 7,2–7,6.

68. Способ воплощений 50–67 части В, где перед стадией очистки мультимодальной жидкостной хроматографией рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV подвергают стадии анионообменной хроматографии.

69. Способ воплощения 68 части В, где стадия анионообменной хроматографии включает

(а) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на смолу, содержащую несущий лиганд субстрат, содержащий четвертичную аминную группу, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим

(i) 10–30 мМ фосфата и 100–130 мМ хлорида натрия, рН 6,0–8,0 или

(ii) 10–30 мМ фосфата и 40–130 мМ хлорида натрия, рН 6,0–8,0; и

(б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего

(i) 10–30 мМ фосфата и 200–250 мМ хлорида натрия, рН 6,0–8,0 или

(ii) 10–30 мМ фосфата и 130–250 мМ хлорида натрия, рН 6,0–8,0.

70. Способ воплощения 69 части В, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим

(а) примерно 20 мМ фосфата, примерно 115 мМ хлорида натрия, рН примерно 7,0–7,4; и рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV элюируют

из смолы с использованием буферного раствора, содержащего примерно 20 мМ фосфата натрия, примерно 225 мМ хлорида натрия и рН примерно 7,0–7,4 или

(б) примерно 20 мМ фосфата, примерно 80 мМ хлорида натрия, рН примерно 7,3–7,7; и рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV элюируют из смолы с использованием буферного раствора, содержащего примерно 20 мМ фосфата натрия, примерно 180 мМ хлорида натрия и рН примерно 7,3–7,7.

71. Способ воплощений 68–70 части В, где перед стадией анионообменной хроматографии рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV подвергают стадии аффиноподобной хроматографии.

72. Способ воплощения 71 части В, где стадия аффиноподобной хроматографии включает

(а) внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на смолу, содержащую декстрансульфат, где смолу уравнивают

(i) 40–60 мМ фосфата натрия при рН 6,0–8,0; или

(ii) 30–60 мМ фосфата натрия при рН 6,0–8,0;

и

(б) элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего 10–30 мМ фосфата натрия, 200–270 мМ хлорида натрия, рН 6,0–8,0.

73. Способ воплощения 72 части В, где

(а) смолу уравнивают буферным раствором, содержащим

(i) примерно 47 мМ фосфата натрия, рН примерно 7,0–7,4 или

(i) примерно 40 мМ фосфата натрия, рН примерно 7,1–7,5;

и

(б) рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV элюируют из смолы с использованием буферного раствора, содержащего

(i) примерно 20 мМ фосфата, примерно 235 мМ хлорида натрия, при рН примерно 7,0–7,4 или

(ii) примерно 20 мМ фосфата натрия, примерно 240 мМ хлорида натрия, при рН примерно 7,2–7,6.

74. Способ воплощений 71–73 части В, при котором

(а) перед стадией аффиноподобной хроматографии рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV подвергают стадии инактивации вируса или

(б) после стадии аффиноподобной хроматографии рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV подвергают стадии инактивации вируса.

75. Способ воплощения 71 части В, где стадия инактивации вируса включает

(а) добавление полисорбата-80 в жидкую среду, содержащую рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, до концентрации 0,5–1,5% и инкубацию указанной жидкой среды в течение 10–25 часов при температуре 15–25°C или

(б) добавление полисорбата-80 в жидкую среду, содержащую рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, до концентрации 0,5–2,5% и инкубацию указанной жидкой среды в течение 10–25 часов при температуре 15–25°C.

76. Способ воплощения 75 части В, при котором

(а) жидкую среду доводят до концентрации примерно 1,0% и инкубируют указанную жидкую среду в течение примерно 15–20 часов при контролируемой комнатной температуре или

(б) жидкую среду доводят до концентрации примерно 2,0% и инкубируют указанную жидкую среду в течение примерно 18–24 часов при контролируемой комнатной температуре.

77. Способ воплощений 50–76 части В, при котором после стадии очистки мультимодальной жидкостной хроматографией следует стадия фильтрования вируса.

78. Способ воплощения 77 части В, при котором стадия фильтрования вируса включает предварительное фильтрование на мембране, имеющей порог отсека примерно 0,1 мкм, и фильтрование с использованием мембраны, имеющей порог отсека примерно 19 нм.

79. Способ воплощений 77–78 части В, при котором после стадии фильтрования вируса следует стадия ультрафильтрации/диафильтрации.

80. Способ воплощения 79 части В, при котором используют мембрану с порогом отсека молекулярной массы примерно 50 кДа и буферный раствор для диафильтрации, содержащий примерно 10 мМ фосфата калия и примерно 5% трегалозы.

81. Способ воплощений 50–80 части А, дополнительно включающий стадию лиофилизации рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV.

82А. Способ изготовления композиции любого из воплощений 1–11 части А или воплощений 1–11 части В, включающий продукцию рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV путем культивирования клетки-хозяина

воплощений 35–37 части В в жидкой среде, и выполнение на жидкой среде, содержащей рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV:

(а) стадии инактивации вируса, включающей добавление полисорбата-80 в жидкую среду, содержащую рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, до концентрации примерно 1,0% и инкубацию указанной жидкой среды в течение 18–22 часов при контролируемой комнатной температуре;

(б) стадии аффиноподобной хроматографии, включающей внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на смолу, содержащую декстрансульфат, где смолу уравнивают примерно 50 мМ фосфата натрия при pH примерно 7,0–7,4, и элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего примерно 20 мМ фосфата натрия, примерно 235 мМ хлорида натрия, при pH примерно 7,0–7,4;

(в) стадии анионообменной хроматографии, включающей внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на смолу, которая содержит лиганд, несущий четвертичную аминную группу, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим примерно 20 мМ фосфата и примерно 115 мМ хлорида натрия при pH примерно 7,0–7,4, и элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего примерно 20 мМ фосфата натрия, примерно 225 мМ хлорида натрия при pH примерно 7,0–7,4;

(г) стадии очистки методом мультимодальной жидкостной хроматографии с использованием связанного с лигандом субстрата, где лиганд содержит N-бензил-N-метилэтанолламин, где указанная очистка методом мультимодальной жидкостной хроматографии включает, во-первых, внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на указанный связанный с лигандом субстрат в присутствии буферного раствора для внесения, содержащего примерно 225 мМ хлорида натрия при pH примерно 7,0–7,4, и, во-вторых, элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из указанного связанного с лигандом субстрата в присутствии буферного раствора элюирования, содержащего примерно 250 мМ цитрата натрия, примерно 300 мМ аргинина, примерно 20 мМ фосфата натрия, pH примерно 7,0–7,4;

(е) стадии фильтрации вируса, включающей предварительное фильтрование на мембране, имеющей порог отсека примерно 0,1 мкм, и фильтрование с использованием мембраны, имеющей порог отсека примерно 19 нм,

где рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV проходит через эти мембраны;

(е) стадии ультрафильтрации/диафильтрации с использованием мембраны, имеющей порог отсекающей молекулярной массы примерно 50 кДа, и буферного раствора для диафильтрации, содержащего примерно 10 мМ фосфата калия, примерно 5% трегалозы, с получением ретентата, содержащего рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV;

(ж) стадии фильтрования с использованием фильтра, имеющего порог отсекающей примерно 0,2 мкм или менее.

82В. Способ изготовления композиции любого из воплощений 1–11 части А или воплощений 1–11 части В, включающий продукцию рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV путем культивирования клетки-хозяина воплощений 35–37 части В в жидкой среде, и выполнение на жидкой среде, содержащей рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV:

(а) стадии аффиноподобной хроматографии, включающей внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на смолу, содержащую декстрансульфат, где смолу уравнивают примерно 40 мМ фосфата натрия, при рН примерно 7,1–7,5, и элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего примерно 20 мМ фосфата натрия, примерно 240 мМ хлорида натрия, при рН примерно 7,2–7,6;

(б) стадии инактивации вируса, включающей добавление полисорбата-80 в жидкую среду, содержащую рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, до концентрации примерно 2,0% и инкубацию указанной жидкой среды в течение 18–24 часов при контролируемой комнатной температуре;

(в) стадии анионообменной хроматографии, включающей внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на смолу, которая содержит лиганд, несущий четвертичную аминную группу, где смолу уравнивают буферным раствором, содержащим примерно 20 мМ фосфата и примерно 80 мМ хлорида натрия, при рН примерно 7,3–7,7, и элюирование растворимого полипептида белка F RSV из смолы с использованием буферного раствора, содержащего примерно 20 мМ фосфата натрия, примерно 180 мМ хлорида натрия при рН примерно 7,3–7,7;

(г) стадии очистки методом мультимодальной жидкостной хроматографии с использованием связанного с лигандом субстрата, где лиганд содержит N-бензил-N-метилэтаноламин, где указанная очистка методом мультимодальной жидкостной

хроматографии включает, во-первых, внесение рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV на указанный связанный с лигандом субстрат в присутствии буферного раствора для внесения, содержащего примерно 180 мМ хлорида натрия при рН примерно 7,3–7,7, и, во-вторых, элюирование рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из указанного связанного с лигандом субстрата в присутствии буферного раствора элюирования, содержащего примерно 250 мМ цитрата натрия, примерно 300 мМ аргинина, примерно 20 мМ фосфата натрия, рН примерно 7,0–7,6;

(е) стадии фильтрования вируса, включающей предварительное фильтрование на мембране, имеющей порог отсека примерно 0,1 мкм, и фильтрование с использованием мембраны, имеющей порог отсека примерно 20 нм, где рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV проходит через эти мембраны;

(е) стадии ультрафильтрации/диафильтрации с использованием мембраны, имеющей порог отсека молекулярной массы примерно 50 кДа, и буферного раствора для диафильтрации, содержащего примерно 10 мМ фосфата калия, примерно 4% трегалозы, с получением ретентата, содержащего рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV;

(ж) стадии фильтрования с использованием фильтра, имеющего порог отсека примерно 0,2 мкм или менее.

83. Способ по любому из воплощений 82А–В части В, дополнительно включающий стадию лиофилизации.

84. Способ разделения совокупности тримеров по любому из воплощений 1–11 части В на совокупность тримеров, в которой большинство тримеров содержит по меньшей мере один F' протомер, и на совокупность тримеров, в которой большинство тримеров содержит 3 F-протомер, где указанный способ включает стадию хроматографии Capto MMC ImpRes.

85. Способ воплощения 84 части В, где на стадии хроматографии Capto MMC ImpRes используют градиент NaCl от 0 до 250 мМ, 20 мМ фосфата натрия, 1 М цитрата натрия.

86. Способ воплощения 84 части В, где градиент хлорида натрия проводят в 20 объемах колонки.

Общие сведения

Если не объяснено иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют такое же значение, как обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится описание данного изобретения. Термины единственного числа включают соответствующие термины множественного числа, если в контексте явным образом не указано иное. Аналогично слово «или» подразумевает включение «и», если в контексте явным образом не указано иное. Термин «множество» относится к двум или более. Дополнительно числовые ограничения, приведенные в отношении концентраций или уровней вещества, например концентраций компонентов раствора или их соотношений и условий реакции, таких как значения температуры, давления и времени цикла, подразумевают как приблизительные. Используемый в настоящем документе термин «примерно» подразумевает количество $\pm 10\%$. Под термином «в диапазоне от... до» в отношении числового диапазона подразумевают включение конечных точек диапазонов, если в диапазоне явным образом не указано исключение этих конечных точек.

Изобретение будет дополнительно описано со ссылкой на приведенные ниже, не имеющие ограничительного характера фигуры и примеры.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Продукция рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV в клетках CHO

A. Методология продукции

Для продукции антигена последовательность рекомбинантного полипептида, кодирующую рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, интегрировали в клетки-хозяева CHO. Для продукции рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV флакон с рабочим банком клеток размораживали, и клетки размножали при плотности засева жизнеспособных клеток $0,2 \times 10^6$ клеток/мл за три последовательных стадии во встряхиваемых колбах, используя среду для клеточных культур, в инкубаторе с диоксидом углерода при приблизительно 37°C в контролируемых условиях содержания CO_2 в течение нескольких дней, а затем размножали путем двух последовательных засевов в биореактор при приблизительно 37°C , физиологическом значении pH и контролируемых условиях содержания CO_2 в течение нескольких дней. Размноженную культуру использовали для засева промышленного биореактора при соответствующей плотности жизнеспособных клеток при температуре приблизительно 37°C , физиологическом значении pH и контролируемых условиях содержания CO_2 . Биореактор запускают при менее 90%

рабочего объема (РО) с двумя различными подпитками. Первую подпитку выполняют в количестве 1% РО ежедневно, когда культура достигает примерно 5×10^6 клеток/мл, а вторую подпитку начинают спустя два дня и проводят ежедневно в количестве 0,2% РО. Когда плотность культуры удваивается, температуру снижают до значения менее 35°C , pH регулируют с помощью CO_2 и NaOH, растворенный кислород регулируют с помощью чистого кислорода. После завершения культивирования культуру собирают. Графики плотности жизнеспособных клеток, жизнеспособности и накопления продукта представлены на ФИГ. 3А и ФИГ. 3В.

Культуру собирают посредством фильтрации, включающего соединенные в параллели первичное и вторичное фильтрование, с получением осветленной ферментационной среды. Первичный фильтр представляет собой D_0HC с площадью фильтрования $0,022 \text{ м}^2$ на 1 литр культуры; вторичный фильтр представляет собой X_0HC с площадью фильтрования $0,011 \text{ м}^2$ на 1 литр культуры. Фильтрат дополнительно фильтруют с помощью фильтра $0,2 \text{ мкм}$, чтобы уменьшить бионагрузку для последующей очистки. Выход сбора культуры составляет примерно 75%, при этом общее содержание белков клеток-хозяев СНО составляет 40%, а уровень снижения содержания ДНК клеток-хозяев СНО составляет 4 log.

В. Дополнение к методологии производства

Для производства антигена последовательность рекомбинантного полипептида, кодирующую рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, интегрировали в клетки-хозяева СНО. Для производства рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV флакон с рабочим банком клеток размораживали, и клетки размножали при плотности засева жизнеспособных клеток $0,2 \times 10^6$ клеток/мл за три последовательные стадии во встряхиваемых колбах на среде для клеточных культур в инкубаторе с диоксидом углерода при приблизительно 37°C в контролируемых условиях содержания CO_2 в течение нескольких дней, а затем размножали путем двух последовательных засевов в биореактор при приблизительно 37°C , физиологическом значении pH и контролируемых условиях содержания CO_2 в течение нескольких дней. Для засева во второй посевной биореактор необходимо однократное добавление 5% объема биореактора модифицированной среды DM133 через 70–74 часа после засева. Размноженную культуру используют для засева промышленного биореактора при плотности жизнеспособных клеток $1,0 \times 10^6$ клеток/мл при температуре приблизительно 37°C , физиологическом значении pH и контролируемых условиях содержания CO_2 . Биореактор запускают при менее 90% рабочего объема (РО) с добавлением в

биореактор 2,5% (об./об.) количества модифицированной среды DM133 непосредственно перед засевом. 2,5% (об./об.) количества модифицированной среды добавляют в биореактор непосредственно перед засевом. Первую подпитку выполняют в количестве 1,25% РО ежедневно, начиная со 2-го дня, а вторую подпитку начинают спустя два дня и проводят ежедневно в количестве 0,5% РО. Когда плотность культуры достигает $10-14 \times 10^6$ клеток/мл, температуру снижают до 33°C, pH регулируют с помощью CO_2 и NaOH, растворенный кислород регулируют с помощью чистого кислорода. После завершения культивирования культуру собирают. Графики плотности жизнеспособных клеток, жизнеспособности и накопления продукта представлены на ФИГ. 23А и ФИГ. 23В.

Культуру собирают посредством фильтрования, включающего соединенные в параллели первичное и вторичное фильтрование, с получением осветленной ферментационной среды. Для первичного осветления культуру прокачивают через фильтр D0SP площадью фильтра 0,66 м². Затем частично осветленный сбор культуры прокачивают через фильтр X0SP с площадью фильтра 0,33 м², соединенного в параллели. Фильтрат дополнительно фильтруют с помощью фильтра 0,2 мкм, чтобы уменьшить бионагрузку для последующей очистки. Выход сбора культуры составляет примерно 75%, при этом общее содержание белков клеток-хозяев СНО составляет 40%, а уровень снижения содержания ДНК клеток-хозяев СНО составляет 4 log.

Пример 2. Очистка рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из клеток СНО

А. Методы

(1) Производство фармацевтической субстанции/промежуточного нерасфасованного раствора рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV основано на одной промышленной серии периодической культуры с подпиткой.

Для выделения рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV клеточную культуру собирают путем глубинного фильтрования. Отфильтрованный сбор культуры подвергают инактивации вируса путем добавления детергента. Промежуточный продукт после инактивации вируса улавливают с помощью хроматографии Capto DeVirS в режиме связывания/элюирования. Затем элюат Capto DeVirS дополнительно очищают с помощью хроматографии Capto Q ImpRes в режиме связывания/элюирования. Далее элюат Capto Q ImpRes подвергают конечной очистке Capto Adhere в режиме связывания/элюирования. Элюат Capto Adhere обрабатывают на стадии фильтрования вируса. Затем фильтрат после фильтрования вируса

концентрируют и заменяют буферный раствор с последующим добавлением конечного эксципиента, регулируют концентрацию и фильтруют через фильтр 0,2 мкм. Все хроматографические гели, используемые в данной очистке, произведены компанией GE-Healthcare.

Цель стадии инактивации вируса заключается в удалении устойчивых к детергентам вирусов, таких как оболочечные вирусы. К собранному материалу добавляют полисорбат-80 при постоянном перемешивании до достижения целевой концентрации 1,0%. Проводят инкубацию в течение 15–20 часов при контролируемой комнатной температуре в защищенном от света месте. Остановку инактивации вируса проводят посредством хроматографии захвата на стадии процесса Capto DeVirs; время инкубации заканчивается с окончанием загрузки на стадию Capto DeVirs.

Первая стадия очистки представляет собой аффиноподобную хроматографию с использованием смолы Capto DeVirS в режиме связывания/элюирования. Цель очистки на колонке Capto DeVirS заключается в захвате рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из промежуточного продукта после инактивации вируса, уменьшении объема и снижении общего содержания примесей для дальнейшей последующей обработки. Для этой стадии пул с инактивированными вирусами разводят водой до достижения целевой проводимости 6 мСм/см. После регулирования проводимости материал вносят на колонку Capto DeVirs, предварительно уравновешенную 47 мМ фосфата натрия pH 7,0–7,4. После промывания колонки буферным раствором для уравновешивания пул рекомбинантного растворимого белка F RSV элюируют раствором 20 мМ фосфата натрия, 235 мМ хлорида натрия pH 7,0–7,4 со скоростью 200 см/ч.

Вторая стадия очистки представляет собой анионообменную хроматографию с использованием смолы Capto Q ImpRes в режиме связывания/элюирования. Цель очистки на колонке Capto Q ImpRes заключается в повышении чистоты продукта (подтвержденной с помощью ОФ-ВЭЖХ) и уменьшения содержания белков (НСР) и ДНК клетки-хозяина. Хроматографию Capto Q ImpRes также определяют как стадию удаления вирусов. Для этой стадии проводимость пула элюирования с колонки Capto DeVirs регулируют до 15,0 мСм/см путем разведения водой. После регулирования проводимости материал вносят на колонку Capto Q ImpRes, предварительно уравновешенную раствором 20 мМ фосфата натрия, 115 мМ хлорида натрия, pH 7,0–7,4. После промывания колонки буферным раствором для уравновешивания пул

рекомбинантного растворимого белка F RSV элюируют раствором 20 мМ фосфата натрия, 225 мМ хлорида натрия pH 7,0–7,4 со скоростью 200 см/ч.

Третья стадия очистки представляет собой хроматографию в смешанном режиме с использованием смолы Capto Adhere в режиме связывания/элюирования. Цель очистки на колонке Capto Adhere заключается в снижении содержания высокомолекулярных соединений и НСР. Хроматографию Capto Adhere также определяют как стадию удаления вирусов. Для этой стадии пул из колонки Capto Q ImpRes непосредственно наносят на колонку Capto Adhere со скоростью 200 см/ч; колонка предварительно уравновешена раствором 20 мМ фосфата натрия, 225 мМ хлорида натрия, pH 7,0–7,4. После промывания колонки буферным раствором для уравновешивания пул рекомбинантного растворимого белка F RSV элюируют раствором 20 мМ фосфата натрия, 250 мМ цитрата натрия, 300 мМ аргинина, pH 7,0–7,4, со скоростью 200 см/ч.

Смола Capto Adhere представляет собой мультимодальную анионообменную смолу, оптимизированную для удаления агрегатов, удаления белков клетки-хозяина и клиренса вирусов. Лиганд смолы для хроматографической смолы Capto Adhere представляет собой N-бензил-N-метилэтанолламин; этот лиганд может взаимодействовать с белками посредством электростатических взаимодействий, образования водородных связей и гидрофобных взаимодействий. Для процесса очистки рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV белок вносят при проводимости 27 мСм/см, pH 7,0–7,4; буфер для внесения содержит приблизительно 225 мМ хлорида натрия. Условия, при которых рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV связывается с Capto Adhere, способствуют взаимодействию между гидрофобными компонентами образца и гидрофобными компонентами смолы Capto Adhere. Буферный раствор для элюирования состоит из 20 мМ фосфата натрия, 250 мМ цитрата натрия, 300 мМ аргинина, pH 7,0–7,4. После нанесения буфера рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV элюирует из колонки Capto Adhere. Используемые в данном процессе условия допускают клиренс MuLV не менее 4,28 log и клиренс MVM 3,2 log.

Таблица 1.

Log снижение Значения (LRV)	MuLV №1	MuLV №2	MVM №1	MVM №2
C30 Capto Adhere	$\geq 4,42 \pm 0,32$	$\geq 4,28 \pm 0,26$	$3,24 \pm 0,17$	$4,05 \pm 0,31$

После стадий хроматографии следует стадия фильтрования вируса с помощью фильтров Planova 20N (Asahi Kasei). В качестве предварительного фильтра используют фильтр Opticap XL5 PVDF с мембраной 0,1 мкм. Цель этой стадии процесса заключается в удалении потенциальных вирусов, присутствующих в промежуточных пулах процесса.

Следующая стадия очистки представляет собой стадию ультрафильтрации/диафильтрации, выполняемую на мембране Pellicon 3 PES Biomax (MWCO 50 кДа) производства компании Millipore. Цель этой стадии заключается в концентрировании продукта и замене матрицы против буферного раствора для диафильтрации, состоящего из 10 мМ фосфата калия и 5% трегалозы. Ретентат диафильтрации удаляют из системы, после чего проводят промывку системы. Жидкость после промывки системы добавляют к ретентату диафильтрации до достижения концентрирования в диапазоне от 1,2 мг/мл до 1,5 мг/мл.

Цель этой стадии приготовления препарата фармацевтической субстанции заключается в регулировании конечной композиции эксципиентов фармацевтической субстанции до конечного содержания 0,05% PS-80 и концентрировании до целевого значения 1 мг/мл. Затем фармацевтическую субстанцию окончательно фильтруют через фильтр 0,2 мкм, делят на аликвоты и замораживают в морозильной системе. Фармацевтическую субстанцию хранят при -70°C до дальнейшей обработки.

(2) Производство фармацевтической субстанции/промежуточного нерасфасованного раствора рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, основанное на одной промышленной серии периодической культуры с подпиткой, можно также выполнять, как описано ниже.

Для выделения рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV клеточную культуру собирают путем глубинного фильтрования. Отфильтрованный сбор культуры улавливают с помощью хроматографии Capto DeVirS в режиме связывания/элюирования. Затем элюат колонки Capto DeVirS подвергают инактивации

вируса путем добавления детергента. Промежуточный продукт после инактивации вируса дополнительно очищают с помощью хроматографии Capto Q ImpRes в режиме связывания/элюирования. Далее элюат Capto Q ImpRes подвергают конечной очистке Capto Adhere в режиме связывания/элюирования. Элюат Capto Adhere обрабатывают на стадии фильтрования вируса. Затем фильтрат после фильтрования вируса концентрируют и заменяют буферный раствор с последующим добавлением конечного эксципиента, регулируют концентрацию и фильтруют через фильтр 0,2 мкм. Все хроматографические гели, используемые в данной очистке, произведены компанией GE-Healthcare.

Первая стадия очистки представляет собой аффиноподобную хроматографию с использованием смолы Capto DeVirS в режиме связывания/элюирования. Цель очистки на колонке Capto DeVirS заключается в захвате рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из собранной культуры, уменьшении объема и снижении общего содержания примесей для дальнейшей последующей обработки. Для этой стадии собранную культуру разводят водой до достижения целевой проводимости 5,25 мСм/см. После регулирования проводимости материал вносят на колонку Capto DeVirS, предварительно уравновешенную 40 мМ фосфата натрия pH 7,1–7,5. После промывания колонки буферным раствором для уравнивания пула рекомбинантного растворимого белка F RSV элюируют раствором 20 мМ фосфата натрия, 240 мМ хлорида натрия pH 7,2–7,6 со скоростью 275 см/ч.

За стадией захвата следует стадия инактивации вируса. Цель стадии инактивации вируса заключается в удалении устойчивых к детергентам вирусов, таким как оболочечные вирусы. К собранному материалу добавляют полисорбат-80 при постоянном перемешивании до достижения целевой концентрации 2,0%. Проводят инкубацию в течение 18–24 часов при контролируемой комнатной температуре (22–24°C) в защищенном от света месте. Остановку инактивации вируса проводят посредством разведения пула после инактивации вируса перед следующей стадией хроматографии.

За стадией инактивации вируса следует анионообменная хроматография с использованием смолы Capto Q ImpRes в режиме связывания/элюирования. Цель очистки на колонке Capto Q ImpRes заключается в повышении чистоты продукта (подтвержденной с помощью ОФ-ВЭЖХ) и уменьшения содержания белков (НСР) и ДНК клетки-хозяина. Хроматографию Capto Q ImpRes также определяют как стадию удаления вирусов. Для этой стадии проводимость пула элюирования с колонки Capto

DeVirs регулируют до 10,9 мСм/см путем разведения водой. После регулирования проводимости материал вносят на колонку Capto Q ImpRes, предварительно уравновешенную раствором 20 мМ фосфата натрия, 80 мМ хлорида натрия, pH 7,3-7,7. После промывания колонки буферным раствором для уравновешивания пул рекомбинантного растворимого белка F RSV элюируют раствором 20 мМ фосфата натрия, 180 мМ хлорида натрия pH 7,3–7,7 со скоростью 200 см/ч.

Третья стадия очистки представляет собой хроматографию в смешанном режиме с использованием смолы Capto Adhere в режиме связывания/элюирования. Цель очистки на колонке Capto Adhere заключается в снижении содержания высокомолекулярных соединений и НСР. Хроматографию Capto Adhere также определяют как стадию удаления вирусов. Для этой стадии пул из колонки Capto Q ImpRes непосредственно наносят на колонку Capto Adhere со скоростью 200 см/ч; колонка предварительно уравновешена раствором 20 мМ фосфата натрия, 180 мМ хлорида натрия, pH 7,3-7,7. После промывания колонки буферным раствором для уравновешивания пул рекомбинантного растворимого белка F RSV элюируют раствором 20 мМ фосфата натрия, 250 мМ цитрата натрия, 300 мМ аргинина, pH 7,2-7,6, со скоростью 150 см/ч.

Смола Capto Adhere представляет собой мультимодальную анионообменную смолу, оптимизированную для удаления агрегатов, удаления белков клетки-хозяина и клиренса вирусов. Лиганд смолы для хроматографической смолы Capto Adhere представляет собой N-бензил-N-метилэтанолламин; этот лиганд может взаимодействовать с белками посредством электростатических взаимодействий, образования водородных связей и гидрофобных взаимодействий. Для процесса очистки рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV белок вносят при проводимости 21 мСм/см, pH 7,3-7,7; буфер для внесения содержит приблизительно 180 мМ хлорида натрия. Условия, при которых рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV связывается с Capto Adhere, способствуют взаимодействию между гидрофобными компонентами образца и гидрофобными компонентами смолы Capto Adhere. Буферный раствор для элюирования состоит из 20 мМ фосфата натрия, 250 мМ цитрата натрия, 300 мМ аргинина, pH 7,2-7,6. После нанесения буфера рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV элюирует из колонки Capto Adhere. Используемые в данном процессе условия допускают клиренс MuLV более 4,81 log и клиренс MVM более 3,15 log.

После стадий хроматографии следует стадия фильтрования вируса с помощью фильтров Virosart HF (Sartorius Stedim). В качестве предварительного фильтра используют фильтр Virosart Max с мембраной 0,1 мкм. Цель этой стадии процесса заключается в удалении потенциальных вирусов, присутствующих в промежуточных пулах процесса.

Следующая стадия очистки представляет собой стадию ультрафильтрации/диафильтрации, выполняемую на мембране Pellicon 3 PES Biomax (MWCO 50 кДа) производства компании Millipore. Цель этой стадии заключается в концентрировании продукта и замене матрицы против буферного раствора для диафильтрации, состоящего из 10 мМ фосфата калия и 4 % трегалозы. Ретентат диафильтрации удаляют из системы, после чего проводят промывку системы. Жидкость после промывки системы добавляют к ретентату диафильтрации до достижения концентрирования в диапазоне от 0,9 мг/мл до 1,3 мг/мл.

Цель этой стадии приготовления препарата фармацевтической субстанции заключается в регулировании конечной композиции эксципиентов фармацевтической субстанции до конечного содержания 0,05% PS-80. Затем фармацевтическую субстанцию окончательно фильтруют через фильтр 0,2 мкм, делят на аликвоты и замораживают в морозильной системе. Фармацевтическую субстанцию хранят при – 70 °С до дальнейшей обработки.

Таблица 1А. Описанным выше способом постоянно получают продукт, обладающий чистотой (% рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV), определенной методом Э-ВЭЖХ на отдельных партиях.

Количественное определение	Прогон процесса								
	CR 1	CR 2	CR 3	CR 4	SUIT29	SUIT30	SUIT32	SUIT34	SUIT36
Промышленный масштаб	12 л	12 л	12 л	12 л	200 л	200 л	200 л	200 л	200 л
Чистота, %	99	98,7	98,6	98,9	98	97,6	97,9	97,8	98,3

В. Содержание p27 в полученной фармацевтической субстанции

Автором изобретения обнаружено, что в определенной доле полученных в ходе экспрессии протомеров рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV была определена последовательность пептида p27; они были названы «F'», чтобы отличать

их от доли протомеров рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV, в которых последовательность пептида p27 не обнаружена («F»). Не желая ограничиваться какой-либо теорией, считают, что в ходе экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из клеток-хозяев некоторая доля сайтов расщепления фурином остается нерасщепленной.

Следуя описанной выше методике, получили фармацевтическую субстанцию со следующими долями F (также обозначен как пик пре-F) и F' (также обозначен как пик пре-F' или p27), определенными методом ОФ-ВЭЖХ, показанными в таблице 2.

Таблица 2. Описанным выше способом постоянно получают продукт, обладающий чистотой (% рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, определенный методом ОФ-ВЭЖХ), как показано в таблице.

Количественное определение	<u>Прогон процесса</u>								
	CR 1	CR 2	CR 3	CR 4	TT01	CR01	TX01	MSR01	GMP 1
Промышленный масштаб	10 л	10 л	10 л	10 л	10 л	10 л	30 л	30 л	225 л
Чистота (пик F + F'), %	96,7	99,1	99,5	98,9	100	100	99,9	99	99,8

С. Разделение тримеров, обогащенных F протомерами, и тримеров, содержащих F' протомеры

Рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, очищенный с использованием описанного выше способа, дополнительно очищали с помощью хроматографии Capto MMC ImpRes (GE Healthcare). Материал для внесения (pH 7,1, проводимость 1,5 мСм/см), наносили на колонку Capto MMC ImpRes (9,4 мл, HiScreen). Колонка была предварительно уравновешена раствором 20 мМ фосфата натрия, pH 7,2. После промывания колонки буферным раствором для уравновешивания проводили элюирование градиентом NaCl от 0 до 250 мМ, 20 мМ фосфата натрия, 1 М цитрата Na в 20 объемах колонки (объем фракции 3 мл). Фракции анализировали в геле для электрофореза в ДСН-ПААГ с окрашиванием Кумасси синим и ОФ-ВЭЖХ. Фракции объединяли в два пула на основании их чистоты по ОФ-ВЭЖХ и содержания пептида p27. Пул 1 состоял из фракций с примерно 100% основного пика по обращенно-фазовой сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-СВЭЖХ). Пул 2 состоял из фракций с примерно 33% p27 (F' протомер) и 67% основного пика. Таким

образом, было идентифицировано и выделено две совокупности: тример, содержащий примерно 100% основного пика (F протомер), и другой тример с примерно 33% пептида p27 (F' протомер) и 67% основного пика (F протомер).

Пример 3

А. Профилирование белков клетки-хозяина и количественное определение GRP78

Рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, полученный описанным выше способом, восстанавливали ДТТ на основании заявленных концентраций, алкилировали изоацетамидом и подвергали ферментативному гидролизу трипсином в течение ночи при 37°C. Затем гидролизат подкисляли и анализировали методом ЖХ-МС/МС с помощью устройства Thermo Fusion Orbitrap, работающего в информационно-зависимом режиме сбора данных. Поиск перечня пиков из исходных данных проводили в сравнении с базой данных белков, содержащей последовательность рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV и последовательности всех известных и спрогнозированных белков CHO с помощью программы поиска Mascot. Был обнаружен только один белок клетки-хозяина (HCP) GRP78 (78 кДа регулируемый глюкозой белок), который является известным HCP.

Также проводили направленное количественное определение GRP78 методом масс-спектрометрии с изотопным разведением. Содержание белка клетки-хозяина в препарате также определяли методом ИФА, такого как ИФА Cygnus CHO hcp. Результаты показали, что содержание GRP78 в материалах, полученных в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, составляет 0,013%.

В. Агрегация

Для оценки уровня агрегации рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, полученного описанным выше способом, использовали разработанную внутреннюю методику количественного определения методом эксклюзионной хроматографии (ЭХ). ЭХ разделяет белки в соответствии с их размером. В таблице 3 показан % распределения низкомолекулярных, основного пика и высокомолекулярных соединений.

Таблица 3. Распределение высокомолекулярных соединений, основного пика и низкомолекулярных соединений в материалах рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV.

Образец	% ВМС	% основного пика	% НМС
Рекомбинантный растворимый белок F RSV, полученный способом (выше)	1,5	96,9	1,6

С. Занятость сайта N500

Рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV модифицирован N-гликанами на 3-х остатках Asn (N27, N70 и N500; нумерация аминокислот основана на полноразмерном предшественнике F RSV). В части совокупности рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV сайт N500 может быть не гликозилирован. Для определения уровней негликозилированного N500 триптические пептиды рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, полученного описанным выше способом, анализировали методом ЖХ-МС/МС до и после обработки ПНГазой F (пептид:N-гликозидаза F), на основании которого сравнивали интенсивности K.I500NQLAFIR.K (SEQ ID NO:4) (представляет собой негликозилированный N500) и K.I500DQLAFIR.K (SEQ ID NO:5) (представляет собой N500 с гликаном, удаленным ПНГазой F). Результаты показывает, что он содержит примерно 7,2% неполного гликозилирования.

D.

1. Целостность первичной последовательности и посттрансляционная модификация

Интактные молекулярные массы рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, полученного описанного выше способом, анализировали методом ЖХ-МС на масс-спектрометре Waters Xevo G2-S QTOF. После развертки спектра молекулярная масса основного соединения была определена как 61226 Да. Тот же материал был де-N-гликозилирован ПНГазой F, а затем анализирован аналогичным образом. Молекулярная масса была определена как 54162 Да, что превосходно согласовывалось с теоретической массой, рассчитанной по первичной последовательности рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV. Эти результаты подтверждают вывод о том, что 1) первичные последовательности являются такими, как ожидалось; и 2) неожиданных посттрансляционных модификаций, кроме гликозилирования, не происходит.

2. Содержание тримера FFF' и протомера F'

Впоследствии проводили анализ ОФ-ВЭЖХ. Как показано на ФИГ. 8, F' можно было легко определить в материале рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV. Также использовали катионообменную хроматографию со слабыми катионами (СКОХ), которая позволяет разделить тример FFF и F'-содержащие тримеры. Рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV разделялся на исходном уровне на два пика (тримеры, содержащие только F протомеры, и тримеры, содержащие по меньшей мере один F' протомер).

Е. Профиль гликанов

Было выполнено профилирование гликанов. Сначала N-гликаны отщепляли от рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, полученного описанным выше способом, затем метили 2-AB путем восстановительного аминирования, разделяли гидрофобной жидкостной хроматографией (ГЖХ) и обнаруживали/определяли количественно с помощью флуоресцентного (FLR) и МС детекторов. Структуры гликанов (в схематичной форме) и относительная представленность гликановых соединений показаны на ФИГ. 4. Как и ожидалось, более 75% молекул гликанов были представлены 3 основными соединениями гликана, наблюдаемыми в рекомбинантном растворимом полипептиде белка F RSV, полученном описанным выше способом, которые представляли собой дисиазированные/фукозилированные двухантенные, моносиализированные/фукозилированные двухантенные и несиализированные/фукозилированные двухантенные гликаны. Большинство гликанов в этом материале представляют собой сиализированные гликаны.

Ф. Целостность эпитопов сайта Ø и сайта V

Наблюдали, что рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV нестабилен в определенных условиях хранения и претерпевает самопроизвольные конформационные изменения, приводящие к измеримому снижению (методом анализа смещения Fab-фрагмента антитела) связывания антитела в сайте Ø и сайте V, причем эти конформационные изменения влияют на увеличенную долю RSVPreF3 (исходно идентифицированного с использованием термина «DS-Cav1» и переименованного в настоящем документе в RSVPreF3, чтобы отличать его от материала, полученного, как описано в работе McLellan et. al. Science (2013) vol. 342 p. 592, WO2014160463 и идентификаторе ClinicalTrials.gov: NCT03049488) в течение времени хранения в жидком буферном растворе.

Для оценки целостности сайта Ø и сайта V был разработан анализ Fab-смещения. В этом анализе используют эксклюзионную хроматографию — жидкостную хроматографию (ЭХ-ЖХ) для разделения рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, которые предварительно инкубировали с Fab-фрагментами, которые специфично связываются с сайтом Ø и сайтом V соответственно. Fab-связанный рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV будет иметь больший размер молекулы и, следовательно, элюироваться с колонки ЭХ раньше, и его можно, таким образом, отделить от несвязанного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV. Результаты показаны в таблице 4 (процент несмещенного белка в анализе).

Таблица 4. Хроматограммы ЭХ Fab-смещения рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV

Материал	% отсутствия смещения по сравнению с	
	Ат к сайту V	Ат к сайту Ø
Рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV	11	15

G. Изоэлектрическая точка (pI)

Рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, полученный в соответствии с описанным выше способом, также содержит сialiрированные N-гликаны. Для разделения молекул с различными зарядами в рекомбинантном растворимом полипептиде белка F RSV использовали гель-электрофорез с изоэлектрическим фокусированием. pI рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV находилась в диапазоне примерно 5,3–6,0.

H. Скорость седиментации

Эксперименты по определению скорости седиментации аналитическим ультрацентрифугированием (СС-АУЦ) проводили на аналитической ультрацентрифуге Optima XL-A (Beckman Coulter, г. Фуллертон, штат Калифорния, США), оборудованием оптической системой сканирования в УФ-видимой области. Все эксперименты проводили при 10°C после уравнивания в течение 1 ч после достижения температуры АУЦ при скорости ротора 30000 об/мин и детектировании при 280 нм. Образцы и материал сравнения вносили в угольно-эпоксидные двухсекторные ячейки Beckman с 12 мм центральным элементом и кварцевыми окнами. Анализ данных проводили с помощью программы Sedfit (с любезного согласия Peter Schuck, Национальный институт здравоохранения (НИН)). Парциальный удельный

объем 0,74 мл/г для рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, полученного с использованием описанного выше способа, был рассчитан с помощью Sednterp на основании аминокислотной последовательности, и был использован в анализе. Плотность и вязкость буферного раствора, использованного в анализе, также рассчитывали с помощью программного обеспечения Sednterp на основании состава буферного раствора. Использовали непрерывное $s(s)$ распределение с 300 сканами. После подтверждения отсутствия сигнала, седиментирующего вне этого диапазона, был использован диапазон от 0 до 15 Сведбергов при разрешении 300 точек на распределение и доверительном интервале 0,95. В качестве исходного уровня подбирали радиально-независимый шум и независимый от времени шум, при этом положение мениска и нижнее положение устанавливали вручную. В анализе использовали наиболее точный подбор коэффициента трения.

Основной пик согласуется с молекулами от умеренной до высокой продолговатости с молекулярной массой примерно 178 кДа. Следует отметить наблюдаемую высокую степень асимметрии. По кристаллической структуре рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV выглядит приблизительно как вытянутый эллипсоид лишь с незначительным различием между основной и минорной осями. Молекулы с коэффициентом трения примерно 2 можно моделировать либо как вытянутый эллипсоид с основной и минорной осями 69,1 и 2,5 нм, либо как сплюснутый эллипсоид с основной и минорной осями 26,6 нм и 0,6 нм.

I. Резюме

В физико-химических исследованиях рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, полученного в соответствии с описанным выше способом, наблюдали получение по меньшей мере 99,9% чистотого рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV (масс./масс.). Кроме того, профили гликозилирования рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, полученного в соответствии с описанным выше способом, характеризуются содержанием более 75% сиалированных гликанов, представленных тремя основными пиками гликанов по сравнению с семью или более в рекомбинантном растворимом полипептиде белка F RSV, полученном в соответствии со стандартными способами. Что касается rI , рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, полученный в соответствии с описанным выше способом, имел rI менее 7,8, что указывает на оптимальные условия культивирования клеток CHO (различия rI , вероятно, отражают профиль гликозилирования). Уровень агрегации, полученный в соответствии с

описанным выше способом, был ниже по сравнению с рекомбинантным растворимым полипептидом белка F RSV, полученным стандартными способами. При хранении в жидкости связывание в сайте Ø и сайте V, измеренное в анализе Fab-смещения, уменьшалось со временем. Кроме того, результаты описанного выше способа по содержанию НСР были ниже, чем в композициях рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, описанных в опубликованной литературе.

Пример 4. Исследования связывания сайта Ø и сайта V

Рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV несет в себе метастабильный антигенный сайт Ø, на который нацелено нейтрализующее антитело. При хранении рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV в жидком препарате при 5°C наблюдалась постепенная утрата связывания с сайтом Ø связывания антитела. McLellan et al. (2013) Structure-Based Design of a Fusion Glycoprotein for Respiratory Syncytial Virus, *Science*, 342: 592–598. На основании совмещения кристаллических структур авторы выдвинули гипотезу о том, что в результате значимого перемещения и нарушения упорядоченности в области гептадного повтора А (HRA) рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV может образоваться вторая конформация предслияния с нарушенным сайтом Ø, и они предположили, что мутации, стабилизирующие петли, соединяющие части вторичной структуры области HRA, могут сохранять сайт Ø при долгосрочном хранении при 5°C. Было показано, что рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV с модификациями N67I и S215P не характеризуется утратой связывания сайта Ø связывания антитела в течение 60-дневного периода хранения при 5°C. Krarup et al (2015), A highly stable prefusion RSVF vaccine derived from structural analysis of the fusion mechanism, *Nat Commun*, 6: 8143. В другом исследовании стабильности материалов рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV при хранении при 4°C наблюдали такое же явление, и в дополнение к этому показано, что параллельно с нарушением сайта Ø был лучше доступен эпитопный сайт I. Flynn (2016) Stability Characterization of a Vaccine Antigen Based on the Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein, *Plos One*, 10: 1–18. Авторы настоящего изобретения наблюдали, что домен, причастный к утрате связывания сайта Ø, перекрывается с сайтом V и, следовательно, также влияет на связывание антитела с сайтом V.

Для дальнейшего исследования причин утраты связывания сайта Ø с антителом использовали комбинацию аналитических и биофизических методов. Наблюдали, что модификации первичной последовательности белка и агрегация не вносят вклад в

связывание сайта Ø с антителом. Оказалось, что рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV существует в двух различных конформациях после длительного хранения в жидком растворе. В свете полученных данных более вероятным считали локализованное конформационное изменение в домене вблизи сайта Ø, чем сам эпитопный сайт Ø. Хотя данные показали, что реактивы, стабилизирующие белки, не защищают рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV от утраты эффективности связывания антитела с сайтом Ø в жидком препарате, лиофилизированный препарат был защищен.

А. Материалы и методы

Не содержащий метку рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV и материалы RSV-F после слияния, использованные в этом исследовании, экспрессировали в клетках CHO, очищали из супернатанта клеточной культуры интенсивным фракционированием на колонках и готовили препарат в концентрации примерно 1 мг/мл в фосфатном буферном растворе с низкими концентрациями ПАВ и дисахаридов при нейтральном pH. Все остальные реактивы приобретали в компании Fisher Scientific, если не отмечено иное.

1. Эксклюзионная хроматография и анализ Fab-смещения

Эксклюзионную хроматографию — жидкостную хроматографию (ЭХ-ЖХ) проводили на колонке Acquity BEH SEC (4,6 мм X 150 мм, 1,7 мкм) на системе СВЭЖХ Waters Acquity в изократическом режиме с буферным раствором 100 мМ фосфата натрия, 50 мМ хлорида натрия при pH 7. Скорость потока составляла 0,2 мл/мин, и детектирование проводили в УФ свете при 215 нм и 280 нм. Для анализа Fab-смещения рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV сначала смешивали и инкубировали с Fab фрагментом антитела, связывающего сайт Ø, или антитела, связывающего сайт V, при 37°C в течение приблизительно одного часа. Затем рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, соответствующий Fab фрагмент и реакционную смесь хроматографировали на ЭХ-ЖХ, чтобы установить время удерживания свободного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV (несмещенная фракция), свободного Fab фрагмента и комплекса рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV с Fab фрагментом (смещенная фракция) соответственно. Хроматограмму интегрировали с помощью программного обеспечения Empower 3, и для относительного количественного определения использовали площади пиков.

2. Электрофорез в ДСН-ПААГ

Гель-электрофорез проводили с использованием 4–12% готового полиакриламидного геля Бис-Трис. Приблизительно 10 мкг образца, смешанного с буферным раствором для нанесения проб на ДСН-ПААГ, содержащим ДТТ, сначала нагревали при 70°C, наносили в каждую лунку, а затем прилагали напряжение 200 В на 45 мин. После электрофореза гели окрашивали Кумасси синим, удаляли окрашивание раствором метанола/воды/уксусной кислоты, а затем визуализировали на системе визуализации BioRad ChemiDoc.

3. Пептидное картирование

В рекомбинантном растворимом полипептиде белка F RSV, полученном описанным выше способом, денатурированным хлоридом гуанидиния, буферный раствор заменяли 50 мМ бикарбоната аммония, восстанавливали ДТТ при 56°C и алкилировали йодацетамидом при комнатной температуре в темном месте. Добавляли трипсин в отношении фермента к субстрату 10: 1 и инкубировали в течение ночи при 37°C. Гидролизат подкисляли муравьиной кислотой, вводили на колонку Acquity VEN C18 (2,1 мм X 150 мм, 1,7 мкм), разделяли в возрастающем градиенте ацетонитрила в 0,1%-м растворе муравьиной кислоты и проводили электрораспыление на масс-спектрометре Waters Xevo G2-S QTOF для обнаружения.

4. Дифференциальная сканирующая флуориметрия (ДСФ)

ДСФ проводили с помощью прибора нано-ДСФ Prometheus (NanoTemper Technologies, Inc., г. Мюнхен, Германия). 10 мкл каждого исследуемого образца в концентрации 1 мг/мл (примерно 5,5 мкмоль) добавляли в тонкие капилляры и загружали в прибор. Проводили линейное повышение температуры от 20°C до 110°C со скоростью 1°C в минуту. Для мониторинга изменений флуоресценции тирозина и триптофана при длинах волны 330 нм и 350 нм в зависимости от температуры в приборе нано-ДСФ используется внутренняя методика флуоресценции. Для более точного определения начала разворачивания белка и общей температуры плавления также выводили первый след производного из необработанных данных.

5. Круговой дихроизм (КД)

Эксперименты по КД проводили на спектрометре ChiraScan Q100 (Applied Photophysics, Inc., г. Беверли, штат Массачусетс, США) при комнатной температуре. Данные КД в ближнем УФ (250–340 нм) собирали для образца 1 мг/мл при 60 нм/мин с шириной полосы 1 нм в кварцевой кювете (длина пути 1 см). Полученные спектры корректировали по исходному уровню с помощью буферного раствора и

нормализовали с использованием абсолютной площади под кривой. Все данные собирали в трех повторах и проводили сравнение подобия средних значений для каждой временной точки хранения с использованием статистического анализа (данные не представлены).

6. Масс-спектрометрия водородно-дейтериевого обмена (HDX-МС)

Анализ HDX-МС проводили на управляющем устройстве Waters HDX с системой LEAP, соединенной с масс-спектрометром Xevo G2-S QTOF. Все исследуемые материалы анализировали в трех повторах. Каждый исследуемый материал разводили в 20 раз раствором 10 мМ фосфата калия в H₂O или D₂O и инкубировали в течение времени 0, 0,5, 5, 10, 30 и 240 минут. Обмен гасили при 0°C добавлением равного объема раствора 1 моль гидрохлорида гуанидина, 0,25 моль гидрохлорида трис(2-карбок시에тил)фосфина (ТСЕР) при pH 2,5. Образцы сразу подвергали ферментативному гидролизу на колонке с пепсином (Waters) при 20°C. Пептиды концентрировали и заменяли буферный раствор с использованием предколонки Waters Vanguard (2,1x50 мм), разделяли при 0°C на колонке Acquity BEH C18 (1,7 мкм, 1,0 X 100 мм, Waters), а затем анализировали в МС. Анализ данных проводили с использованием глобального сервера ProteinLynx (PLGS) и программного обеспечения DynamX (версия 3.0.0)

7. Модель гомологии

Модель гомологии антитела, связывающего сайт Ø рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, создавали с помощью двух различных матриц кристаллической структуры (pdb: 4mmv и 4jhw) и программы моделирования Molecular Operating Environment. В качестве матричной последовательности использовали последовательность рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV. Две кристаллические структуры применяли в связи с тем, что домен сборки в области 4mmv разупорядочен, и сайты Ø связывания Fab фрагментов антитела не присутствуют ни в одной из структур рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV. Что касается антитела, связывающегося с сайтом V, и антитела, связывающего эпитопный сайт II рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV (антитело к сайту II связывает RSV-F как до, так и после слияния), модели гомологии также создавали с помощью программы Molecular Operating Environment (MOE) для кристаллических структур 4mmv и 4zyk. Для каждой из двух конечных моделей гомологии было создано десять отдельных моделей, и в качестве конечного представления модели гомологии для каждой отдельной системы была выбрана модель

самой низкой энергии. Конечная модель гомологии была минимизирована с помощью программы AMBER10:ЕНТ Forcefield с привязанными ограничениями.

В. Результаты

1. Рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV утрачивает связывание в сайте \emptyset связывания антитела в жидком, но не утрачивает его в лиофилизированном препарате

В дополнение к экспериментам по иммуноанализу, таким как ИФА и поверхностный плазмонный резонанс (ППР), анализ Fab-смещения был применен в качестве ортогонального метода оценки связывания между рекомбинантным растворимым полипептидом белка F RSV и его соответствующими антителами. После совместной инкубации Fab фрагмента и рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV при 37°C в течение одного часа смешанный образец разделяли методом эксклюзионной хроматографии в не денатурирующих условиях. Fab-связанный тример рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV элюируется раньше, поэтому его время удерживания смещается на хроматограмме влево в связи с увеличением молекулярной массы и гидродинамического размера (примерно 330 кДа в случае связывания 3 Fab фрагментов по сравнению с примерно 183 кДа для несвязанного тримера рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV). Процент рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, утратившего сайт \emptyset связывания с антителом, можно рассчитать путем сравнения площадей пиков смещенного и несмещенного соединений. Хроматограмма Fab-смещения рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV с антителом, связывающим сайт \emptyset образца 3-месячного исследования стабильности представлена на Фиг. 5. Свободный тример рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV элюировался через примерно 9,2 мин, при этом рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, связанный с антителом, связывающим сайт \emptyset , смещался в сторону более короткого времени удерживания 8,2 мин. Асимметрия этого смещенного пика была предположительно связана с неоднородностью Fab фрагментов, пик элюирования которых при 11,2 мин также характеризовался асимметрией. Как показано в таблице, вставленной на ФИГ. 5А, данный конкретный рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV имел 86% смещенной фракции, и в материалах для исследования стабильности, которые хранились в жидком препарате при 5°C, этот процент постепенно снижался до 76%, 69% и 58% через 1 месяц, 3 месяца и 7 месяцев. Это наблюдение соответствовало с рядом описанных ранее результатов. По сравнению

с предыдущим предложением об использовании стабилизирующих белки эксципиентов жидкий препарат, задействованный в настоящем исследовании, содержал определенные концентрации дисахарида и неионного ПАВ, но предотвратить утрату связывания в сайте O связывания антитела не удалось. В отличие от жидкого препарата, утрата связывания в сайте O связывания антитела не наблюдалась в образцах, выдержанных при 40°C в течение 2 недель (ФИГ. 5B) и до 6 месяцев при 5°C (ФИГ. 5C для рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV с теми же эксципиентами препарата). Это подтверждает, что рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV поддается лиофилизации, и предполагаемый лиофилизированный препарат может быть предпочтительным для продления срока годности рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, полученного в соответствии с описанным выше способом, и других вакцин, содержащих рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV.

2. Целостность первичной последовательности и агрегация не являются причинами утраты связывания в сайте O связывания антитела

Чтобы определить, происходит ли клипирование белка, проводили гель-электрофорез в ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях для сравнения свежего материала сравнения и материалов 3-месячного исследования стабильности при 5°C. Зрелый рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV представляет собой двухцепочечную молекулу, содержащую полипептиды F1 и F2, связанные вместе внутримолекулярными дисульфидными связями. Как показано на ФИГ. 6A, восстановленный рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV мигрировал в геле в виде двух основных полос. Полоса более высокой молекулярной массы примерно 45 кДа представляла собой полипептид F1; полоса более низкой молекулярной массы примерно 10 кДа представляла собой полипептид F2; минорные полосы выше F1 представляли собой различные гликоформы F1. В целом картины полос в геле для свежего материала сравнения и материала 3-месячного исследования стабильности были очень сходными, что позволяет предположить, что утрата связывания со связывающим антитело сайтом O в материале 3-месячного исследования стабильности не связана с явлением клипирования белка.

Чтобы исследовать вклад фактора агрегации белка, свежий материал и материалы 1 месяца, 3 месяцев и 7 месяцев сравнивали методом ЭХ-ЖХ, и результаты показали очень сходные низкие уровни высокомолекулярных соединений во всех материалах (данные не представлены), показывающие, что агрегация белка не вносит

вклад в утрату связывания в сайте \emptyset связывания антитела (панель на вкладке, ФИГ. 5А).

В дополнение к этому было также выполнено пептидное картирование методом ЖХ-МС/МС с покрытием более 96% последовательности. Как показано на ФИГ. 6В, свежий материал сравнения и материал 3-месячного исследования стабильности характеризовались совершенно одинаковой картиной пептидных отпечатков, что позволяет предположить, что химические модификации, такие как окисление, деаминирование и перестановка дисульфидных связей также не вызывают утрату связывания в сайте \emptyset связывания антитела.

3. Утрата связывания в сайте \emptyset связывания антитела обусловлена структурными изменениями более высокого порядка

3. 1. Круговой дихроизм

Третичные структуры были исследованы методом КД в ближнем УФ свете с длинами волны 250–340 нм. RSV-F после слияния в качестве положительного контроля показал резко отличающийся спектр по сравнению с рекомбинантным растворимым полипептидом белка F RSV (не показан). Свежий материал и материалы исследования стабильности через 1, 3, 7 месяцев показали визуально сходные спектры, но после анализа с использованием более сложного статистического подхода были продемонстрированы различия. В методах сравнения структур более высокого порядка в настоящее время существует тенденция к использованию анализа взвешенной спектральной разности (weighted spectral difference, WSD). Согласно статистическому анализу Tier 2, если все значения WSD различных спектров находятся за пределами $-2\sigma/+2\sigma$ среднего значения базового образца сравнения, два спектра считают статистически различающимися. Средние значения WSD и $-2\sigma/+2\sigma$ свежего материала сравнения рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV составляли 0,000222 и 0,000148/0,000297 соответственно. Все измерения WSD для материалов после 1, 3 и 7 месяцев исследования стабильности находились за пределами диапазона $-2\sigma/+2\sigma$ для свежего материала сравнения рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV (не показано). Кроме того, различия в значениях WSD возрастали со временем, что позволяет предположить, что смещение структур более высокого порядка является не случайным, а происходит в одном направлении конформации постслияния (не показано).

3.2. Дифференциальная сканирующая флуориметрия

Обнаруженные различия в структуре более высокого порядка между свежим материалом сравнения и материалом рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV из исследования стабильности визуально казались незначительными, что могло быть связано с нечувствительностью КД в ближнем УФ к незначительным локализованным конформационным изменениям. Чтобы дополнительно охарактеризовать и подтвердить эти конформационные изменения, были проведены анализ и сравнение материалов с помощью прибора для нано-дифференциальной сканирующей флуориметрии (ДСФ), который позволяет измерять термостабильность белка путем определения температуры начала его плавления (T_{onset}) и температуры плавления (T_m). T_{onset} представляет собой температуру, при которой начинается разворачивание белка, а T_m представляет собой точку, в которой белок разворачивается на 50%. Более высокая структурная стабильность коррелирует с повышенной T_m . Нано-ДСФ позволяет обнаружить и зарегистрировать изменения собственной флуоресценции тирозина и триптофана, которые происходят при разворачивании белка по мере повышения температуры. Рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV содержит 4 остатка триптофана и 20 остатков тирозина, которые хорошо распределены в различных областях на первичной последовательности и в отдельных доменах 3-мерной структуры. По мере разворачивания белка углубленные остатки триптофана и тирозина становятся более подверженными воздействию водной среды. Соответственно, собственная флуоресценция тирозина и триптофана снижается, и их пики испускания смещаются от 330 нм (при их нахождении в углубленном состоянии) до 350 нм (при нахождении в водной среде). Таким образом, в начале события разворачивания белка отношение сигналов флуоресценции, зарегистрированных при 350 нм и 330 нм, начинает увеличиваться. Поскольку температура плавления находится в средней точке кривой 350/330 нм, было рассчитано, что появление первого производного определяет начало события разворачивания и температуру плавления.

Свежий материал сравнения и материалы рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV после 1 месяца, 3 месяцев, 7 месяцев хранения и RSV-F после слияния в концентрации примерно 5,5 мкМ анализировали методом нано-ДСФ. Свежий материал сравнения рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV демонстрировал широкую кривую сравнения с низкой T_{onset} и многочисленными пиками, что позволило предположить, что рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV имеет «гибкую» структуру, и задействованы многочисленные события

развертывания. T_m , зарегистрированная как вершина наиболее интенсивного перехода, составляла $72,2^\circ\text{C}$. Напротив, RSV-F после слияния демонстрировал высокую T_{onset} и отчетливую кривую одного события развертывания с T_m при $92,5^\circ\text{C}$, что позволяет предположить, что RSV-F после слияния имеет более жесткую и более стабильную структуру. Интересно, что кривые плавления для материалов исследования стабильности, хотя T_{onset} в большинстве своем оставалась без изменений, со временем смещались в сторону более высокой температуры. Начиная появляться новый переход с более высокой T_m при примерно $79,1^\circ\text{C}$. Величина этого перехода становилась более интенсивной при длительном времени хранения при 5°C . Одновременно с этим величина основного перехода рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV при $72,2^\circ\text{C}$ снижалась. Хотя кривые плавления материалов исследования стабильности рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV смещались в направлении состояния после слияния, ни в одном случае не было получено перехода выше $79,1^\circ\text{C}$. Характерный резкий переход RSV-F после слияния при $92,5^\circ\text{C}$ по-прежнему отсутствовал в образцах исследования стабильности рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV. (Данные не представлены). В совокупности эти данные позволяют предположить, что в то время как в жидком препарате при 5°C рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV принимает новую конформацию, которая является относительно более стабильной, чем конформация до слияния, она отличается от конформации после слияния и менее стабильна. Эта новая конформация не могла переходить дальше в состояние после слияния.

Было проведено исследование, является ли приобретение этой новой конформации причиной утраты связывания в сайте O связывания антитела и увеличения несмещенной фракции в анализе Fab-смещения. Был собран пик несмещенной фракции связывания Fab фрагмента антитела к сайту O на ЭХ-ЖХ, буферный раствор заменяли на такой же препарат, как в свежем материале сравнения рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, разводили до такой же концентрации и анализировали аналогичным образом методом нано-ДСФ. Для несмещенной фракции были продемонстрированы такие же значения T_{onset} и T_m , как и для новой конформации, приобретенной рекомбинантным растворимым полипептидом белка F RSV в материалах исследования стабильности, а переход при $72,2^\circ\text{C}$, наблюдаемый в свежем материале сравнения рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, полностью отсутствовал. В дополнение к этому также собирали и анализировали смещенную фракцию антитела, связанного с сайтом O , в

которой было показано полное отсутствие перехода при $79,1^{\circ}\text{C}$ (данные не представлены). В совокупности данные ДСФ позволяют предположить, что новая конформация, со временем приобретенная рекомбинантным растворимым полипептидом белка F RSV в жидком состоянии, которая отчетливо отличается от конформации как до, так и после слияния, является коренной причиной утраты связывания в сайте \emptyset связывания антитела, и что в материалах исследования стабильности рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV в жидком препарате существует две совокупности рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, одна из которых приобретает новую конформацию, а другая сохраняет исходную конформацию до слияния.

3.3. HDX-МС

Методами КД в ближнем УФ и нано-ДСФ можно было обнаружить только общие конформационные изменения. Для дальнейшего уточнения конкретной(-ых) локализации(-й) конформационного изменения в 3D-структуре было проведено сравнение свежего материала сравнения и материалов исследования стабильности через 1 месяц и 7 месяцев методом HDX-МС. HDX-МС исследуют на доступность растворителя и/или водородное связывание определенных доменов на структуре белка путем измерения скоростей обмена атомов водорода в амидном каркасе с атомами дейтерия в растворе. В этом исследовании из каждого образца путем расщепления пепсином было получено 249 пептидов, составляющих покрытие последовательности на 96,9%. Значимого обратного обмена не наблюдалось. Для каждой временной точки порог значимости был установлен как 0,2 Да. Таким образом, истинным различием считали только Δ массы более 1,2 Да на один пептид. Из трех исследованных материалов большинство пептидов не имели или имели менее чем значимые уровни различия по захвату дейтерия. Единственное обнаруженное различие сохранялось в аминокислотных остатках 147–163, и величина такого различия между свежим материалом сравнения и материалами исследования стабильности возрастала по мере увеличения времени нахождения в жидком состоянии при 5°C . Аминокислотные остатки 147–163 находятся внутри мотива β_3 – β_4 шпильки β -петли, который находится в непосредственной близости к эпитопному сайту \emptyset . Еще интереснее, что пять пептидов после расщепления пепсином, которые составляли большую часть самого эпитопного сайта \emptyset , не показали никаких различий по захвату дейтерия. В совокупности результаты HDX-МС позволяют предположить, что конформационное изменение, лежащее в основе утраты связывания в сайте \emptyset связывания антитела, не влияет ни на

доступность растворителя, ни на характер связывания водорода в самом сайте \emptyset ; вместо этого, если аминокислотные остатки 142–163, ведущие к сайту \emptyset , подвергаются большему воздействию растворителя или в большей степени утрачивают потенциал связывания водорода, может создаваться стерическое затруднение и препятствие для фиксации связывающего сайт \emptyset Fab фрагмента антитела в сайте \emptyset . Этот результат позволил понять, что внедрение мутации(-й) в эту короткую последовательность для стабилизации этого шпилечного домена может способствовать сохранению активности рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV в качестве антигена вакцины.

3.4. Конформационное изменение является локализованным

Эксперимент с использованием HDX-МС, в котором было обнаружено, что различие по захвату дейтерия проявлялось лишь в небольшом отрезке пептида, дополнительно позволяет предположить, что конформационное изменение, лежащее в основе утраты связывания в сайте \emptyset связывания антитела, вероятнее является локальным, а не глобальным изменением структуры. Было проведено исследование, повлияет ли длительное хранение в жидком препарате при 5°C на связывание между рекомбинантным растворимым полипептидом белка F RSV и двумя другими антителами к RSV-F: антителом, связывающим сайт V, и антителом, связывающим сайт II. Антитело, связывающее сайт V, является активным нейтрализующим антителом, распознающим четвертичный эпитопный сайт V, присутствующий только на тримерной форме RSV-F до слияния. Антитело, связывающее сайт II, распознает эпитопный сайт II, присутствующий в RSV-F как до, так и после слияния. Сайт V и сайт II находятся на одинаковом расстоянии от эпитопного сайта \emptyset , но эпитопный сайт V значимо перекрывается с мотивом β_3 – β_4 (не показано), при этом эпитопный сайт II не перекрывается с ним (не показано). В анализах Fab-смещения с использованием Fab-фрагментов антитела, связывающего сайт V, и антитела, связывающего сайт II, было четко показано, что долгосрочное хранение в жидком виде при 5°C приводит к такой же степени утраты связывания в сайте V со связывающим антителом, как и в случае связывающего антитела к сайту \emptyset , но не влияет на связывание антитела с сайтом II связывания антитела (не показано). На основании этих данных получено дополнительное доказательство, что конформационное изменение происходит вокруг областей β_3 – β_4 . Кроме того, эти данные подтверждают, что новая конформация, принимаемая рекомбинантным растворимым полипептидом белка F RSV в результате

хранения в жидком препарате, приводит скорее к четко локализованному, чем к глобальному структурному изменению.

Пример 6. Аналитическое разделение пре-F' и пре-F методом жидкостной хроматографии

Существует два подхода к аналитическому разделению F' и F протомеров. Первым является метод обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) в денатурирующих условиях, в ходе которой тримеры денатурируют на F и F' протомеры, а затем протомеры разделяют на основании их различий по гидрофобности; второй заключается в катионообменной жидкостной хроматографии со слабыми катионами (СКОХ-ЖХ) в нативных условиях, в ходе которой сохраняется конформация тримеров (FFF или FFF'), а затем они разделяются на основании различия собственного заряда.

Аналитическое разделение F' и F протомеров методом ОФ-ВЭЖХ

Частично очищенная и очищенная фармацевтическая субстанция и лиофилизированный лекарственный препарат (тримеры рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV) были проанализированы с использованием обращенно-фазовой (ОФ) высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), и результаты дополнительно оптимизированы методом сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (СВЭЖХ). Цель ОФ-ВЭЖХ и ОФ-СВЭЖХ заключается в количественном определении концентрации и чистоты фармацевтической субстанции. Два пика F' и F были разделены на основании различия их гидрофобности на ОФ колонках. Пептиды p27 интенсивно гликозилированы гидрофильными N-связанными гликанами, которые придают меньшую гидрофобность F'. Таким образом, F' может раньше элюироваться из обращенно-фазовой колонки на основе C18. Два пика (обозначенные пик №4 и 5), как показано на ФИГ. 9, собирали, подвергали ферментативному гидролизу трипсином и анализировали методом ЖХ-МС/МС, который показал, что триптические пептиды, имеющие происхождение от последовательности пептида p27, присутствуют в пике №4, но отсутствуют в пике №5. Эти результаты без сомнения подтверждают, что пик №4 представляет собой F', а пик №5 представляет собой F. Сводные результаты, полученные методами ОФ-ВЭЖХ и ОФ-СВЭЖХ, используемыми для количественного определения этих пиков, представлены в таблице 5.

Таблица 5. Сводные результаты, полученные методами ОФ-ВЭЖХ и ОФ-СВЭЖХ.

Метод	ОФ-ВЭЖХ			ОФ-СВЭЖХ		
Прибор	Waters Acquity UPLC, Agilent 1100, Agilent 1260			Waters Acquity UPLC		
Подвижная фаза А	0,1% трифторуксусная кислота (ТФУ) в воде			0,1% трифторуксусная кислота (ТФУ) в воде		
Подвижная фаза В	0,1% трифторуксусная кислота (ТФУ) в ацетонитриле			0,1% трифторуксусная кислота (ТФУ) в ацетонитриле		
Колонка	Колонка XBridge C4, 300Å (0,03мкм), 4,6 x 150 мм, 3,5 мкм, Waters, кат. № 186004504			Колонка VEN, C4, 300Å (0,03 мкм), 2,1 x 150 мм, 1,7 мкм, Waters, кат. № 186004497		
Градиент	Время (мин)	% подвижной фазы А	% подвижной фазы В	Время (мин)	% подвижной фазы А	% подвижной фазы В
	0,0	98,0	2,0	0,00	59,0	41,0
	0,1	98,0	2,0	0,55	41,0	59,0
	25,0	30,0	70,0	0,56	1,0	99,0
	30,0	10,0	90,0	0,75	1,0	99,0
	35,0	10,0	90,0	0,76	59,0	41,0
	37,0	98,0	2,0	3,00	59,0	41,0
	45,0	98,0	2,0			
Скорость потока	0,5 мл/мин			0,4 мл/мин		
Оптическая плотность	УФ 215 нм			УФ 280 нм		
Температура колонки	60°C ± 1°C			60°C ± 1°C		
Температура пробы	5°C ± 3°C			5°C ± 3°C		
Время хроматографирования	45 мин			3 мин		

Была проведена тщательная оценка обоих методов по показателям специфичности, линейности, воспроизводимости, правильности, предела количественного определения и предела обнаружения. Было проанализировано несколько партий фармацевтической субстанции и показано содержание F⁷ в диапазоне от 12% до 16%. На ФИГ. 9 и ФИГ. 10 показаны типовые хроматограммы фармацевтической субстанции, полученные методами ВЭЖХ и СВЭЖХ.

Аналитическое разделение тримеров FFF и FFF' методом СКОХ-ЖХ

Существующие аналитические методы, такие как обращенно-фазовая жидкостная хроматография (ОФ-ВЭЖХ) и электрофорез в ДСН-ПААГ, способны к количественному определению F' и F, но не способны определить совокупность тримеров, которые содержат F', поскольку эти методы выполняют в денатурирующих условиях, а тримеры не связаны ковалентными связями. Был определен пробел и потребность в новом аналитическом методе, желательном для расшифровки нативного состояния молекулы и правильного количественного определения наличия F' в тримерах при сохранении тримерной формы.

Для определения характеристик тримеров был разработан новый аналитический метод катионообменной жидкостной хроматографии со слабыми катионами (СКОХ-ЖХ). Этот метод способен к разделению различных форм тримеров (FFF или FFF'). Пептид p27 представляет собой пептид из 27 аминокислотных остатков на N-конце F1 протомера F' протомера, который не отщепляется фурином в процессе культивирования клеток. Метод СКОХ-ЖС способен к отделению на исходном уровне FFF тримера от тримера, содержащего по меньшей мере один F', т.е. FFF'.

Разделение методом ионообменной хроматографии основано на общем поверхностном заряде определяемого вещества и в не денатурирующих условиях. Метод обмена слабых катионов дает возможность разделить тримеры на основании присутствия или отсутствия пептида p27, поскольку пептид этой длины имеет 9 положительно заряженных аминокислот и 4 сиаловых кислоты на двух сайтах гликозилирования, в результате чего присутствие пептида p27 добавляет к сетевому заряду пять положительных зарядов по сравнению с протомером, в котором отсутствует пептид p27.

Таблица 6 (продолжение). Сводные данные, полученные методом СКОХ-ЖХ для RSVPreF3 (первоначально идентифицированного с помощью термина «DS-Cav1» и переименованного в настоящем документе термином RSVPreF3, чтобы отличить его от материала, полученного, как описано в работе McLellan et. al. Science (2013) vol. 342 p. 592, WO2014160463 и идентификаторе ClinicalTrials.gov: NCT03049488).

Метод	СКОХ-ЖХ
Прибор	Waters Acquity UPLC
Подвижная фаза А	100 мМ одноосновного фосфата натрия
Подвижная фаза В	100 мМ двухосновного фосфата натрия
Подвижная фаза С	1 мМ хлорида натрия

Метод	СКОХ-ЖХ
Подвижная фаза D	Вода
Колонка	Колонка ProPac 10 WCX, 4 мм X 150 мм, 10 мкм
Градиент	Для элюирования представляющего интерес белка концентрацию хлорида натрия увеличивают с 0 мМ до 400 мМ за 25 минут
Скорость потока	1 мл/мин
Оптическая плотность	УФ 215 нм
Время хроматографирования	30 мин

СКОХ-ЖС проводят с использованием слабых денатурирующих условий, в которых тримерная форма удерживается вместе за счет С-концевого домена сборки. Когда тримеры рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV подвергают катионообменной хроматографии со слабыми катионами в соответствии с указанными выше экспериментальными условиями, они разделяются на исходном уровне на два отчетливо разделенных пика, обозначенных как пик 1 и пик 2 (ФИГ. 11). Площадь под пиком 1 составляет приблизительно две трети от общей площади пиков, а площадь под пиком 2 — приблизительно одну треть. Для характеристики состава двух пиков фракции по времени собирали с помощью автоматического коллектора фракций, как показано на ФИГ. 12. Эти фракции концентрировали и подвергали дальнейшему разделению методом ОФ-ВЭЖХ, как описано в предыдущих разделах. Результаты ОФ-ВЭЖХ демонстрируют, что пик 1 катионообменной хроматографии со слабыми катионами представляет собой чистый тример FFF, тогда как пик 2 представляет собой F'-содержащие тримеры (ФИГ. 13). Состав F' на пике 2 составляет приблизительно одну треть, а F составляет две трети, что позволяет предположить, что тример в пике 2 состоит из одного F' и двух F протомеров. Дополнительное доказательство обсуждается в последующем разделе.

Моделирование гомологии тримеров рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV позволяет предположить, что немодифицированный пептид p27 точно входит внутрь полости тримера, и моделирование позволяет предположить, что он не будет входить в нее, если к мотивам гликозилирования присоединены гликаны (не показано). В предыдущих экспериментах по профилированию

гликозилирования показано, что оба сайта гликозилирования пептида p27 полностью декорированы сialiрированными двухантенными гликанами. В дополнение к этому обработка фурином *in vitro* отщепляет пептид p27 (данные не показаны). Также, как описано выше, пептид p27 имеет 5 положительных зарядов на боковых цепях. Моделирование гомологии показывает, что отталкивание одинаковых зарядов приводит к предпочтительной локализации на поверхности. Кроме того, F'-содержащие тримеры отделяются от тримеров, не содержащих F', методом хроматографии СКОХ-ЖХ, позволяющим разделять молекулы на основании поверхностных зарядов. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, эти особенности подтверждают вывод о том, что пептид p27 выступает наружу на поверхности тримера рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV.

Кроме наблюдения, что пик 2 на СКОХ-ЖХ содержит F и F' протомеры в соотношении примерно 2, описанные ниже наблюдения подтверждают вывод о том, что исследованные в настоящем документе тримеры имеют один F' протомер. Во-первых, спрогнозированная рI FFF, FFF' и FF'F' на основании моделирования 3D-структуры составляет 8,46, 8,66 и 8,84 соответственно. Для элюирования в СКОХ-ЖХ используют линейный градиент соли. Таким образом, различия по времени удерживания между FFF/FFF' и FFF'/FF'F' должны быть примерно одинаковыми. При спрогнозированном времени удерживания FF'F' пик, элюирующийся из колонки СКОХ, не обнаруживается. См. ФИГ. 14, на которой изображено предполагаемое время удерживания для пика FF'F' (пунктирная кривая внутри пунктирного круга).

Для дальнейшего исследования мутированную форму RSVPreF3 (первоначально идентифицированного с помощью термина «DS-Cav1» и переименованного в настоящем документе термином RSVPreF3, чтобы отличить его от материала, полученного, как описано в работе McLellan et al. Science (2013) vol. 342 p. 592, WO2014160463 и идентификаторе ClinicalTrials.gov: NCT03049488) со стабильно присоединенным пептидом p27 к полипептиду F1 (называемую в настоящем документе «R295»), изучали методом катионообменной хроматографии со слабыми катионами. В R295 сайт расщепления фурином на N-конце цепи F1 мутирован таким образом, что три положительно заряженных аминокислоты заменены незаряженными аминокислотами, в частности Lys->Ser на второй аминокислоте, Arg->Gly на третьей аминокислоте и Arg->Ser на четвертой аминокислоте. Эти мутации препятствуют расщеплению фурином, и R295 существует в форме тримера F'F'F'. Один F' в R295 имеет два сетевых положительных заряда ($5-3=2$) в пептиде p27. Таким образом,

разность зарядов между обычным FFF и R295 F'F'F' составляет шесть положительных зарядов ($2 \times 3=6$). На СКОХ-ЖХ R295 F'F'F' элюируется примерно на 1/2 минуты позже, чем описанные выше спрогнозированные тримеры FFF'. См. ФИГ. 14. Поскольку разность зарядов между R295 F'F'F' и обычным FFF' составляет только один ($6-5=1$), показано, что метод СКОХ-ЖХ позволяет различить разность зарядов, равную лишь 1. Кроме того, для стабилизации конформации тримеров ковалентными связями использовали химическое поперечное сшивание протомеров, содержащих тримеры. В анализе поперечно сшитого тримера методом ЖХ-МС не было обнаружено массы, соответствующей FF'F' или F'F'F' (данные не показаны). В заключение, в результате описанного в настоящем документе исследования совокупности тримеров наблюдали только FFF и FFF', где в одном случае тримеры FFF' составляли примерно 36% от общего содержания.

Пример 7. RSVPreF3 в сравнении с DS-Cav1

Пример рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV (далее в настоящем документе «RSVPreF3») сравнивали с композицией DS-Cav1, описанной в работе McLellan et. al. Science (2013) vol. 342 p. 592, WO2014160463 и идентификаторе ClinicalTrials.gov: NCT03049488, используя методики, включая описанные в примерах 1–4. В приведенном ниже кратком обзоре представлен общий обзор RSVPreF3 и DS-Cav1, использованных в исследованиях.

1. Препараты:
 - a. RSVPreF3
 - i. 10 мМ фосфата калия, 5% трегалозы, 0,05% полисорбата 80, при pH 7,0
 - ii. Форма выпуска – лиофилизированный
 - b. DS-Cav1
 - i. 20 мМ гистидина, 100 мМ хлорида калия, 100 мМ аргинина, 2,5% сахарозы при pH 6,5
 - ii. Форма выпуска представляет собой замороженную жидкость
2. Получение:
 - a. RSVPreF3 получают с использованием клеточной линии CHO, отличающейся от клеточной линии CHO, используемой для получения DS-Cav1
 - b. RSVPreF3 получают, как описано в настоящем документе в другом месте, тогда как DS-Cav1 получают, используя другой способ.

Физико-химическое тестирование

Э-ВЭЖХ. Высокомолекулярные соединения (ВМС) были исследованы с использованием Э-ВЭЖХ для изучения содержания тримеров в двух композициях с получением следующих результатов:

ОБРАЗЕЦ	% ВМС	% основного пика	% низкомолекулярных соединений (НМС)
RSVPreF3*	1,5	96,9	1,6
DS-Cav1**	21,0	74,5	4,5

*1,0 мг/мл

**0,5 мг/мл

Хроматограмма показана на ФИГ. 15. DS-Cav1 выглядит более неоднородным, имеет относительно высокий уровень агрегатов и выглядит меньше по размеру, чем RSVPreF3.

Содержание и чистота. Для исследования содержания и чистоты композиций RSVPreF3 и DS-Cav1 использовали ОФ-ВЭЖХ. См. ФИГ. 18. Сводные результаты представлены ниже в таблицах.

<u>Свойство или метод</u>	<u>Станд. образец RSVPreF3</u>	<u>DS-Cav1</u>
Содержание и чистота методом ОФ-ВЭЖХ	12,9% p27	p27 отсутствует
Вестерн-блоттинг p27	p27 обнаружен	P27 не обнаружен

<u>Описание вещества</u>	<u>Концентрация (мкг/мл)</u>	<u>RSV</u>	<u>RSV</u>	<u>Площадь других пиков, %</u>
		<u>Площадь пика пре-F', %</u>	<u>Площадь пика пре-F, %</u>	
RSVPreF3 1	940	12,9	87,1	Не анализировали
RSVPreF3 2	987	14,8	85,2	Не анализировали
DS-Cav1	428	0,0	99,5	0,5

Профиль тримеров. Для исследования совокупностей FFF и FFF' RSVPreF3 и DS-Cav1 использовали метод катионообменной хроматографии со слабыми катионами (СКОХ). Сводные результаты представлены ниже в таблице.

<u>Свойство или метод</u>	<u>Станд. образец RSVPreF3</u>	<u>DS-Cav1</u>
Совокупности FFF и FFF' (катионообменная хроматография со слабыми катионами)	2 отдельных симметричных, хорошо разделенных пика (FFF и FFF')	DS-Cav1 представляет собой один относительно широкий пик со временем удерживания между FFF и FFF'

Следует отметить, что DS-Cav1 проявляет относительно широкий пик со временем удерживания (ВУ) между FFF и FFF'. Смещение ВУ позволяет предположить, что DS-Cav1 является более щелочным. В материале DS-Cav1 FFF' отсутствует. «Хвосты» DS-Cav1 преимущественно связаны с примесями НСР и неоднородным характером материала. См. ФИГ. 18.

АУЦ. Для исследования молекулярной массы композиций RSVPreF3 и DS-Cav1 использовали скорость седиментации. См. ФИГ. 16. Проводили прогон двух лиофилизированных образцов RSVPreF3; одного жидкого образца RSVPreF3; и одного жидкого образца DS-Cav1. RSVPreF3 был относительно постоянным от одного прогона к другому, и хроматографические пики отдельных соединений не имели плеч. Основной пик DS-Cav1 соответствует более низкой молекулярной массе, чем RSVPreF3, с дополнительным пиком при примерно 3S.

НСР. Содержание НСР исследовали методом электрофореза в ДСН-ПААГ в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях с помощью набора реактивов для НСР (набор реактивов Cygnus F550, имеющийся в продаже от Cygnus Technologies, 4332 Southport Supply Rd., SE Саутпорт, штат Северная Каролина 28461, США) и с использованием масс-спектрометрии. Сводные результаты электрофореза в ДСН-ПААГ приведены в таблице ниже и на ФИГ. 17А.

<u>Свойство или метод</u>	<u>RSVPreF3</u>	<u>DS-Cav1</u>
Невосстанавливающий электрофорез в ДСН-	Показаны ожидаемые полосы,	Основная отдельная полоса меньше по размеру, чем RSVPreF3 F-

ПААГ – (внесение 4 мкг)	известные как гликоформы F и F+p27. Отсутствие полос ВМС	протомер. Несколько полос ВМС могут представлять собой агрегаты или НСР
Восстанавливающий электрофорез в ДСН-ПААГ – (внесение 8 мкг)	Показаны ожидаемые полосы, известные как гликоформы F1, F1+p27, F2. Одна слабая полоса ВМС	Основная отдельная полоса имеет такой же размер, как RSVPreF3 F1. Несколько полос ВМС (могут представлять собой агрегаты или НСР) и многочисленные полосы НМС (могут представлять собой клипированные формы или НСР).

Сводные результаты анализа с помощью набора для НСР и МС представлены в таблице ниже.

Свойство	RSVPreF3	DS-Cav1
нг НСР/120 мкг образца (набор Cygnus F550)	108 нг/120 мкг RSVPreF3	1800 нг/120 мкг DS-Cav1
Профили НСР на МС	В DS-Cav1 обнаружено значительно больше НСР. Наиболее широко представленным НСР является GRP78	

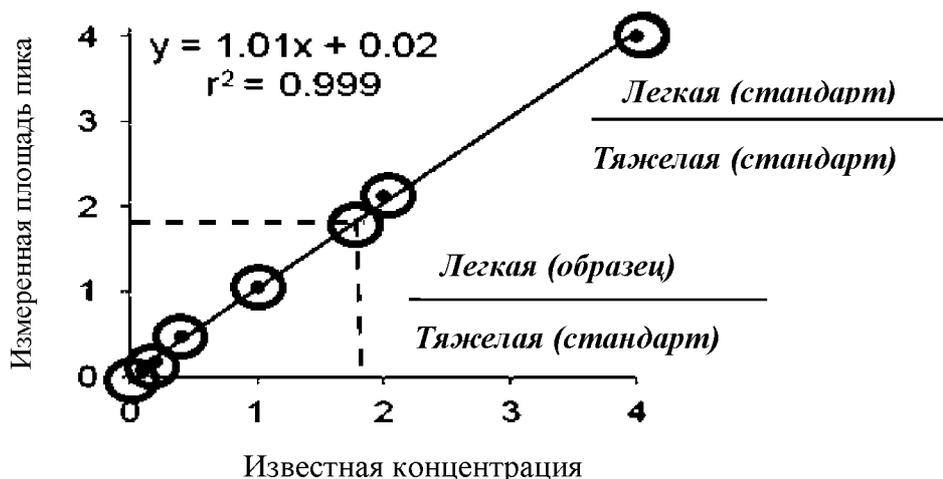
DS-Cav1 содержит дополнительные идентифицированные НСР, включая (по мере уменьшения представленности):

- GRP78
- Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
- Родственный фоллистатину белок 1
- Фосфоглицераткиназа
- Фактор элонгации 2
- Фруктозодифосфатальдолаза А
- Пируваткиназа РКМ
- Пероксиредоксин-1
- Алкогольдегидрогеназа
- Пептидил-пролил-цис-транс-изомераза А
- Коллаген альфа-1
- *Легумин*

- *Лизосомальный защитный белок*
- Кластерин
- Простагландинредуктаза

Обнаружено две протеазы (курсивом). Известно, что протеазы приводят к клипированию в рекомбинантных композициях.

Примеси. Наиболее преобладающим НСР является GRP78. GRP78 измеряли методом направленной масс-спектрометрии с изотопным разведением (МС-ИР). Действие МС-ИР основано на добавлении в исследуемые образцы различных известных количеств стандартных пептидов, меченных изотопами. Стандартную кривую строили путем нанесения на график отношений площадей пиков против концентрации внутренних стандартов (3 пептида из GRP78). Неизвестную концентрацию GRP78 можно рассчитать методом интерполяции путем сравнения относительных значений интенсивности сигналов определяемого вещества с внутренними стандартами:



В материале DS-Cav1 содержание GRP78 было в 10 раз выше по сравнению с RSVPreF3 (см. таблицу ниже и ФИГ.17B).

<u>Материалы</u>	<u>Содержание GRP78</u>	
	<u>% (масс./масс.)</u>	<u>нг/120 мкг</u>
DS-Cav1	0,19%	445 нг/120 мкг
Партия RSVPreF3 GMP	0,013%	15 нг/120 мкг
Станд. образец RSVPreF3	0,047%	62 нг/120 мкг

Гликопрофиль и интактная молекулярная масса (ММ). Интактную ММ определяли методом ЖХ-МС, и при развертке спектра было выявлено, что RSVPreF3 имеет интактную ММ 61226 Да (F, но не F'), а DS-Cav1 имеет интактную ММ 59461 Да. После дегликозилирования обе молекулы имели одинаковую ММ 54162,3 Да (расчетная теоретическая ММ составляет 54163 Да). Это подтверждает вывод о целостности и идентичности первичных последовательностей молекул. Считают, что меньшая ММ в композиции DS-Cav1 связана с отличием состава гликанов от RSVPreF3.

<u>Свойство</u>	<u>Станд. образец RSVPreF3</u>	<u>DS-Cav1</u>
Гликопрофиль	Общий профиль DS-Cav1 подобен стандартному образцу RSVPreF3; полностью гликозилирован на N27 и N70; частично гликозилирован на N500. Представленность негликозилированного N500 незначительно выше в DS-Cav1 (12,3% DS-Cav1 по сравнению с 7,2% в RSVPreF3).	
Интактная ММ	ММ DS-Cav1 незначительно ниже, чем RSVPreF3 (59461 Да DS-Cav1 по сравнению с 61226 Да RSVPreF3). По-видимому, связана с различиями гликозилирования, а не с различиями последовательности. Эти данные согласуются с данными АУЦ и Э-ВЭЖХ	

Иммунологическое тестирование.

Относительная активность *in vitro* (In Vitro Relative Potency, IVRP) была исследована с использованием анализов, включающих сайт-специфичные антитела и поликлональные сыворотки, и получены следующие результаты:

<u>Свойство</u>	<u>Станд. образец RSVPreF3</u>	<u>DS-Cav1</u>
IVRP, сайт 0 (сайт 0 + поликлональная сыворотка анти-DS-Cav1)	Связывание DS-Cav1 незначительно ниже, чем для стандартного образца RSVPreF3	
IVRP, сайт V (сайт V + поликлональная сыворотка анти-DS-Cav1)	Связывание DS-Cav1 незначительно ниже, чем для стандартного образца RSVPreF3.	
IVRP, сайт II (сайт II + поликлональная сыворотка анти-DS-Cav1)	Связывание DS-Cav1 аналогично связыванию стандартного образца RSVPreF3	
IVRP, сайт III (сайт III + поликлональная сыворотка анти-DS-Cav1)	Связывание DS-Cav1 незначительно ниже, чем для стандартного образца RSVPreF3	
IVRP, сайт I (сайт I + поликлональная сыворотка анти-DS-Cav1)	Связывание DS-Cav1 значительно выше, чем для стандартного образца RSVPreF3.	
Поверхностный плазмонный резонанс (Biacore)	Значимые различия в связывании отсутствуют	

Утрату связывания сайта 0 или сайта V исследовали с использованием Fab-смещения (анализа, описанного в настоящем документе в другом месте) и получили следующие результаты:

<u>Свойство</u>	<u>Станд. образец RSVPreF3</u>	<u>DS-Cav1</u>
% связывания препарата с мАт к сайту 0	11% – 17% несмещенных пиков	17%
% связывания препарата с мАт к сайту V	9% несмещенных пиков	16%

Резюме аналитического исследования сравнения RSVPreF3 и DS-Cav1

Сравниваемые свойства:

- Целостность первичной последовательности (интактная последовательность и пептидные карты)
- Отсутствие непредусмотренных посттрансляционных модификаций

- Структура более высокого порядка (термостабильность), измеренная методом ДСФ

- Вторичная структура, измеренная методом КД в дальнем УФ свете
- Неполная занятость гликанами в N500
- Сравнительное связывание (Fab-смещение)

Различающиеся свойства:

- Материал DS-CAV1 имеет более низкий общий уровень чистоты (агрегация, НСР) и более высокое содержание GRP78

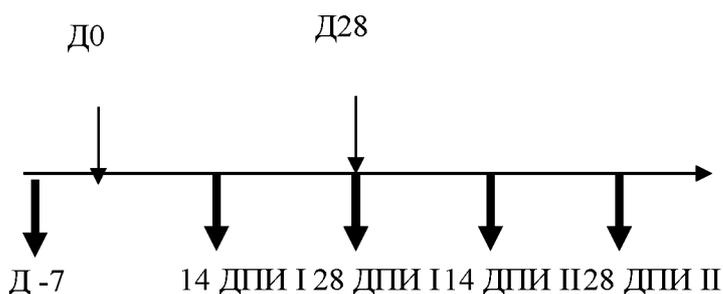
- DS-Cav1 имеет более низкое содержание p27
- DS-Cav1 имеет значимо более низкое содержание p27
- Материал DS-CAV1 имеет более высокий уровень агрегации
- DS-CAV1 содержит значительно отличающийся профиль гликанов, преимущественно нейтральные и более низкомолекулярные гликаны

- В связи с различием гликанового профиля материал DS-CAV1 имеет меньшую ММ и более щелочное значение рI

- Материал DS-CAV1 имеет рI примерно 8, при этом материал RSVPreF3 имеет рI примерно 5-6

Доклиническое исследование у крупного рогатого скота

Иммуногенность композиции RSVPreF3 и композиции DS-Cav1 сравнивали по нейтрализующим антителам (НАт) к RSV А (ФИГ. 20) в соответствии со следующим режимом иммунизации и отбора образцов:



Партия препарата RSVPreF3, приготовленного либо с Al(OH)₃, либо без адьюванта, вызывала более высокие титры НАт к RSV А по сравнению с группой, получавшей физиологический раствор (значения р менее 0,0001 через 14 дней после инокуляции (ДПИ)). Таким образом, была продемонстрирована иммуногенность партии RSVPreF3 у примированного крупного рогатого скота. Между RSVPreF3-Al(OH)₃ и DS-Cav1-Al(OH)₃ наблюдалось статистически значимое различие титров

НАт к RSV А (соотношение геометрических средних (GMR) = 2,7, 95% ДИ: 1,24–5,82), а также наблюдалось различие по кратности их увеличения при более выраженном увеличении титров НАт к RSV А (отношение геометрических средних 14 ДПИ/день - 7) для RSVPreF3-Al(OH)₃ (в 2,7 раза выше при 95% ДИ: 1,03–7,12).

Влияние p27 на иммуногенность у мышей линии CB6F1, ранее не использованных в экспериментах

Тример FFF' сравнивали с тримером FFF по индуцированным RSVPreF3 ответам нейтрализующих антител к RSV А. Для тримеров FFF' была продемонстрирована не меньшая эффективность ответов нейтрализующих антител к RSV А по сравнению с тримерами FFF (14 ДПИ) (GMR = 0,80, 90% ДИ [0,48, 1,32]).

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1 (предшественник рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, содержащего замены S155C, S290C, S190F и V207L)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKENKCNNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMN
YTLNNAKKTNTLSKKRKRRLFLGFLGVSIAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKISALLS
TNKAVVSLSNGVSVLTFKVLDLKKNYIDKQLLPILNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEI
TREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCII
KEEVLAYVVLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSV
SFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVIT
SLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGK
SLYVKGEPINFDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRD
GQAYVRKDGWVLLSTFL

SEQ ID NO:2 (F1 цепь рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, содержащего замены S155C, S290C, S190F и V207L)

FLGFLGVSIAIASGVAVCKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLSNGVSVLTFKVL
DLKKNYIDKQLLPILNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLT
NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMCIIKEEVLAYVVLPLYGVIDTP
CWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDT
MNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNK
NRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPINFDPLVFPS
DEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

SEQ ID NO:3 (F2 цепь рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, содержащего замены S155C, S290C, S190F и V207L)

QNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELD
KYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARR

SEQ ID NO:4 (представлен негликозилированный N500)

KINQSLAFIRK

SEQ ID NO:5 (представлен N500 с гликаном, удаленным ПНГазой F)

KIDQSLAFIRK

SEQ ID NO:6 (фрагмент пептида p27, определяемый масс-спектроскопией)

FMNYTLNNAK

SEQ ID NO:7 (p27)

ELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKKRKRR

SEQ ID NO:8 (F1 цепь F' протомера, содержащего p27)

ELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKKRKRRFLGFL LGVGS AIASGVAVCKVLHLEGEVN
KIKSALLSTNKAVVSL SNGVSVLTFK VLDLKNYIDKQLLPILNKQSCSISNIETVIEFQQ
KNNRLL EITREFSVNAGVTTPVSTYMLT NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQ
QSYSIMCIKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGW
YCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTS
KTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTV SVGNL
YYV NKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAI
GGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFL

SEQ ID NO:9 (нерасщепленный сайт расщепления фурином, X и X₁ независимо представляют собой любую аминокислоту)

RXRRX₁

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенная композиция, содержащая рекомбинантный растворимый полипептид белка F респираторно-синцитиального вируса (RSV), содержащий замены S155C, S290C, S190F и V207L, где указанная композиция содержит более 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% м/м рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV по сравнению с белком клетки-хозяина.

2. Антигенная композиция, содержащая рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, содержащий замены S155C, S290C, S190F и V207L, где указанная композиция содержит более 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% или 96% м/м неагрегированного тримера по сравнению с агрегированным тримером.

3. Антигенная композиция, содержащая рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV, содержащий замены S155C, S290C, S190F и V207L, где указанный растворимый полипептид белка F представляет собой гликозилированный растворимый полипептид белка F, и где указанный гликозилированный растворимый полипептид белка F имеет молекулярную массу более 59,5 кДа, например более 60,0 кДа, более 60,5 кДа или более 61,0 кДа, включая гликозилирование.

4. Антигенная композиция, содержащая совокупность тримеров рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV,

где каждый тример указанной совокупности состоит из трех рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV, независимо выбранных из группы, состоящей из:

(а) рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, содержащего цепь F1, имеющую замены S155C, S290C, S190F и V207L («F протомер»); и

(б) рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, содержащего цепь F1, имеющую замены S155C, S290C, S190F и V207L, дополнительно содержащую по меньшей мере 10 аминокислот пептида p27 («F' протомер»);

и описывается формулой



где n представляет собой целое число от 0 до 3, F представляет собой F -протомер, а F' представляет собой F' -протомер;

где по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 20%, 25% рекомбинантных растворимых полипептидов белка F RSV в совокупности тримеров представляют собой F' протомеры.

5. Антигенная композиция по любому из п. п. 1–4, где F' протомер содержит цепь $F1$, содержащую нерасщепленный сайт расщепления фурином.

6. Антигенная композиция по п. 5, где

(а) F' протомер содержит цепь $F1$, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и цепь $F2$, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; и

(б) F протомер содержит цепь $F1$, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95%-й идентичностью с SEQ ID NO:2, и цепь $F2$, содержащую аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95%-й идентичностью с SEQ ID NO:3.

7. Антигенная композиция по любому из п. п. 1–6, где указанная антигенная композиция лиофилизирована.

8. Иммуногенная композиция, содержащая антигенную композицию по любому из п. п. 1–7 и фармацевтически приемлемый носитель или эксипиент.

9. Иммуногенная композиция по п. 8, дополнительно содержащая адъювант.

10. Иммуногенная композиция по любому из п. п. 8–9, где иммуногенная композиция уменьшает или предотвращает инфекцию RSV.

11. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, содержащая полинуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный растворимый полипептид белка F RSV по любому из п. п. 1–6.

12. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 11.

13. Применение композиции по любому из п. п. 1–7 или иммуногенной композиции по любому из п. п. 8–10 в изготовлении лекарственного средства для лечения инфекции RSV.

14. Способ вызывания иммунного ответа против RSV, включающий: введение субъекту композиции по любому из п. п. 1–7 или иммуногенной композиции по любому из п. п. 8–10.

15. Способ по п. 14, где субъект представляет собой человека.

16. Композиция по любому из п. п. 1–7 или иммуногенная композиция по любому из п. п. 8–10 для применения в медицине.

17. Композиция по любому из п. п. 1–7 или иммуногенная композиция по любому из п. п. 8–10 для профилактики или лечения инфекции RSV.

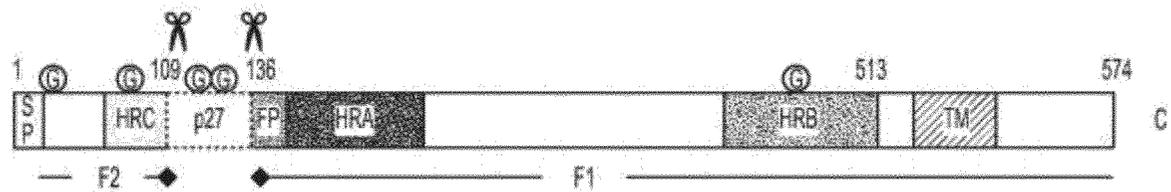
18. Способ изготовления антигенной композиции по любому из п. п. 1–7, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 12 для экспрессии рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV и процесс очистки экспрессированного рекомбинантного растворимого полипептида белка F RSV, включающий стадию очистки посредством мультимодальной жидкостной хроматографии с использованием мультимодальной анионообменной смолы и буферного раствора для элюирования, содержащего космотропный агент и хаотропный агент.

19. Способ по п. 18, где буферный раствор для элюирования содержит:

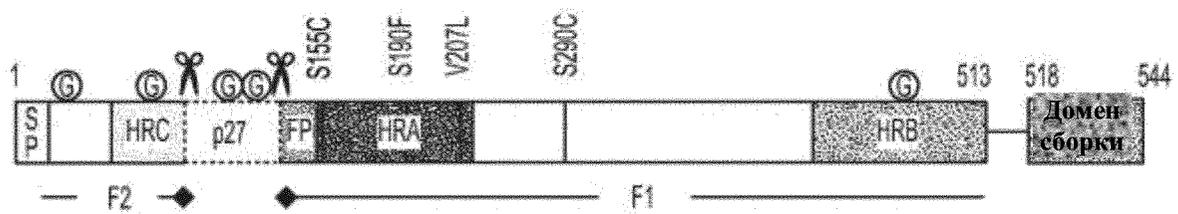
(а) 150–350 мМ, например 200–300 мМ, 225–275 мМ, 230–270 мМ, 235–265 мМ, 240–260 мМ или 245–255 мМ цитрата натрия;

(б) 200–400 мМ, например 250–350 мМ, 275–325 мМ, 280–320 мМ, 285–315 мМ, 290–310 мМ или 295–305 мМ аргинина.

20. Способ по любому из п. п. 18–19, дополнительно включающий стадию лиофилизации.

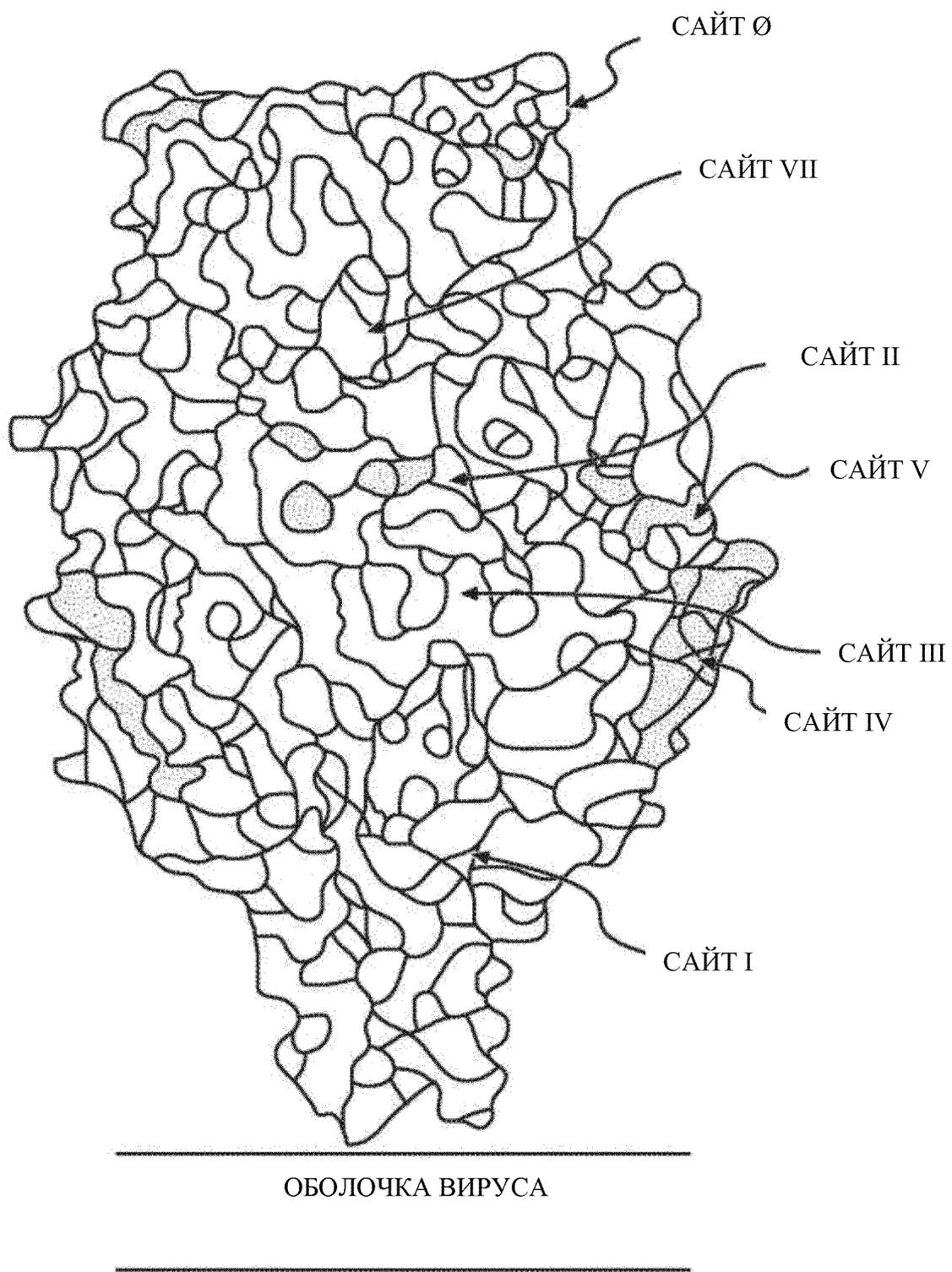


ФИГ. 1А

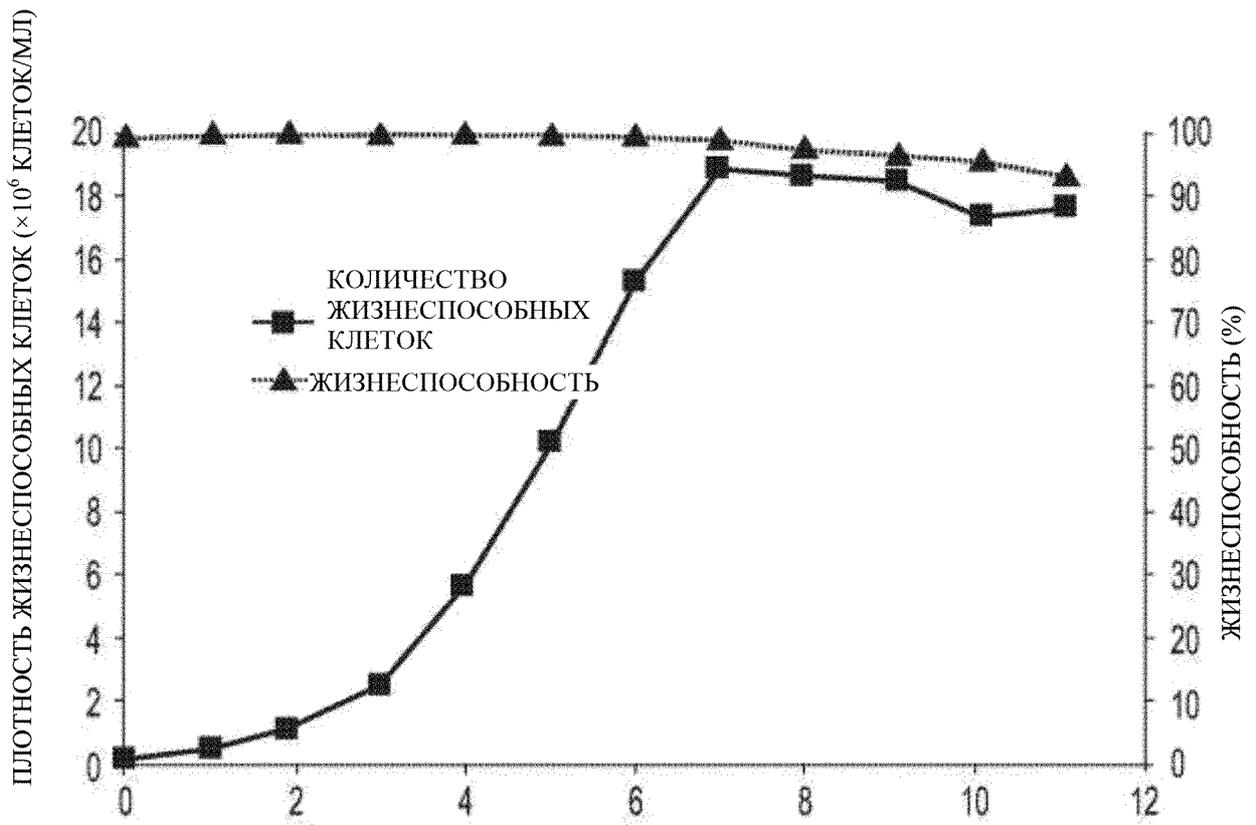


 Сайт расщепления фурином

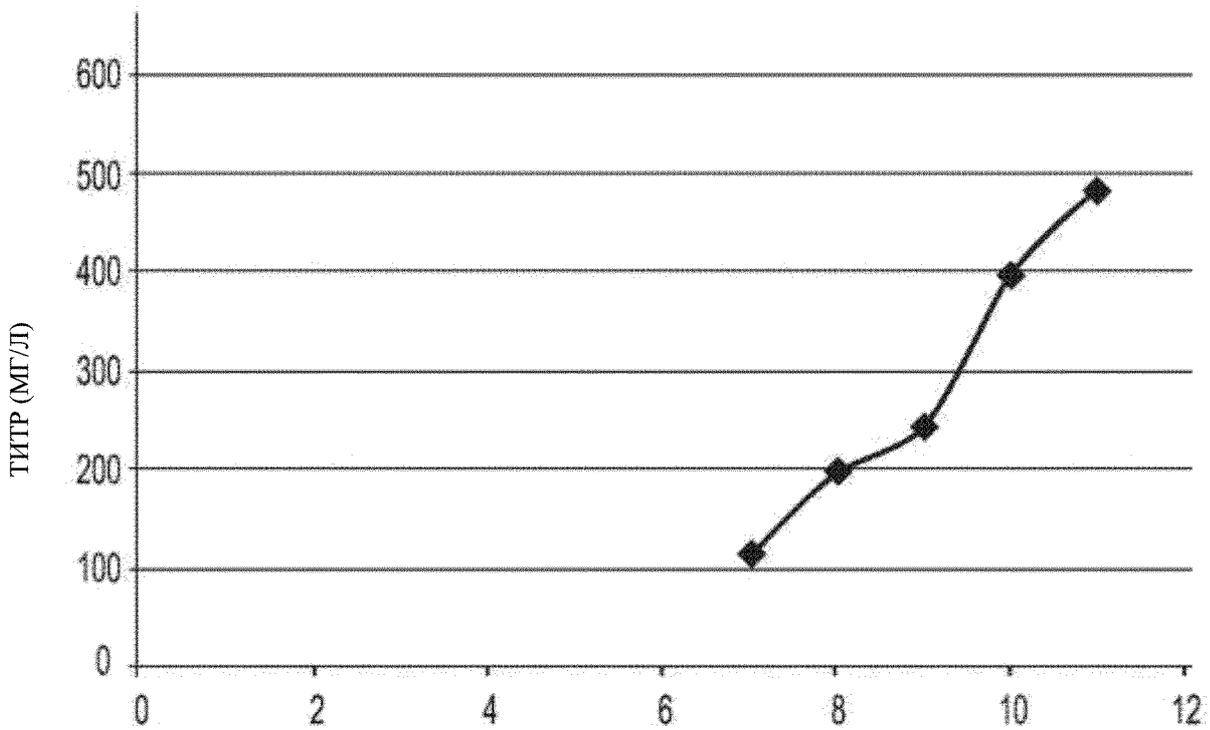
ФИГ. 1В



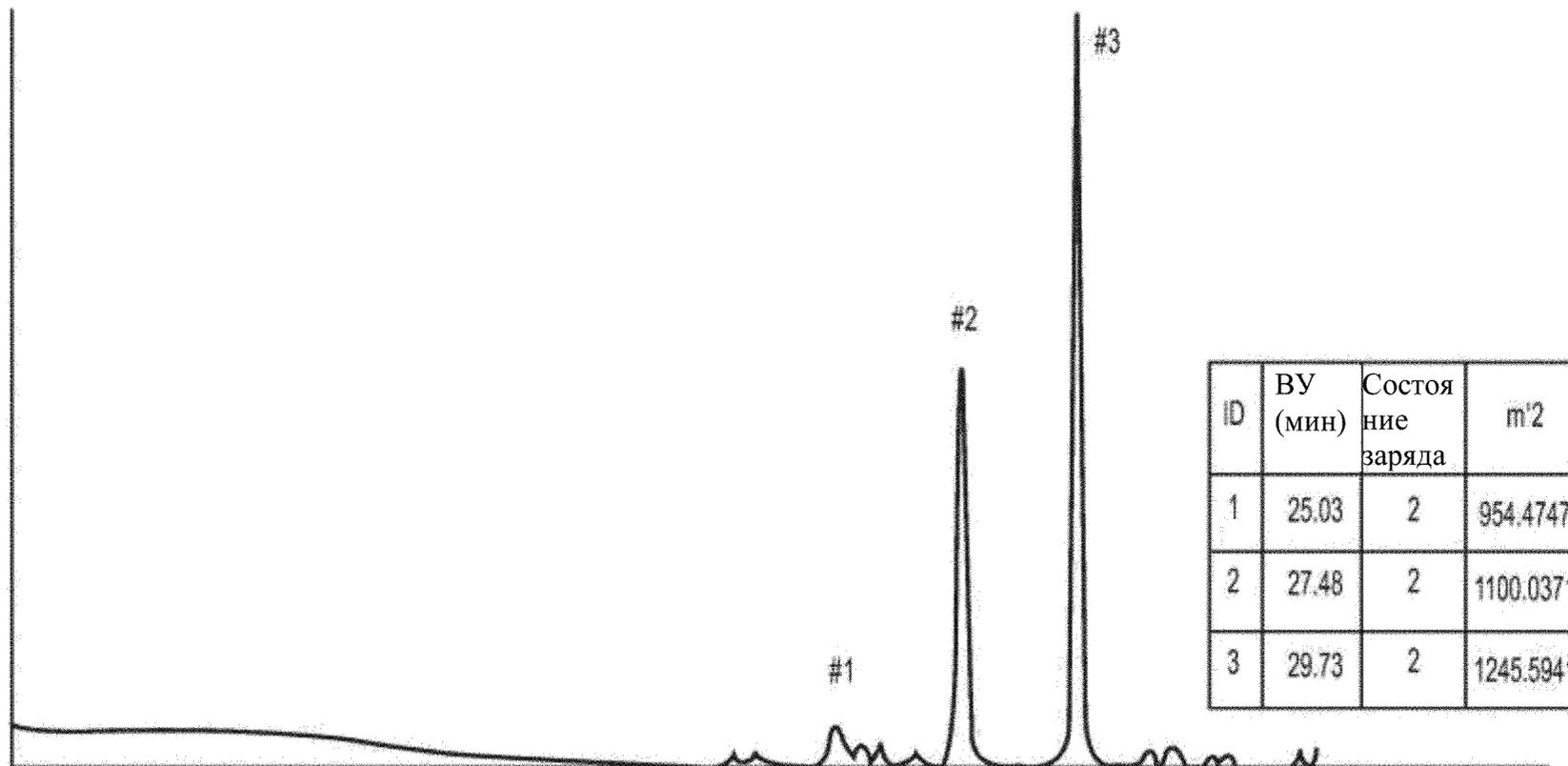
ФИГ. 2



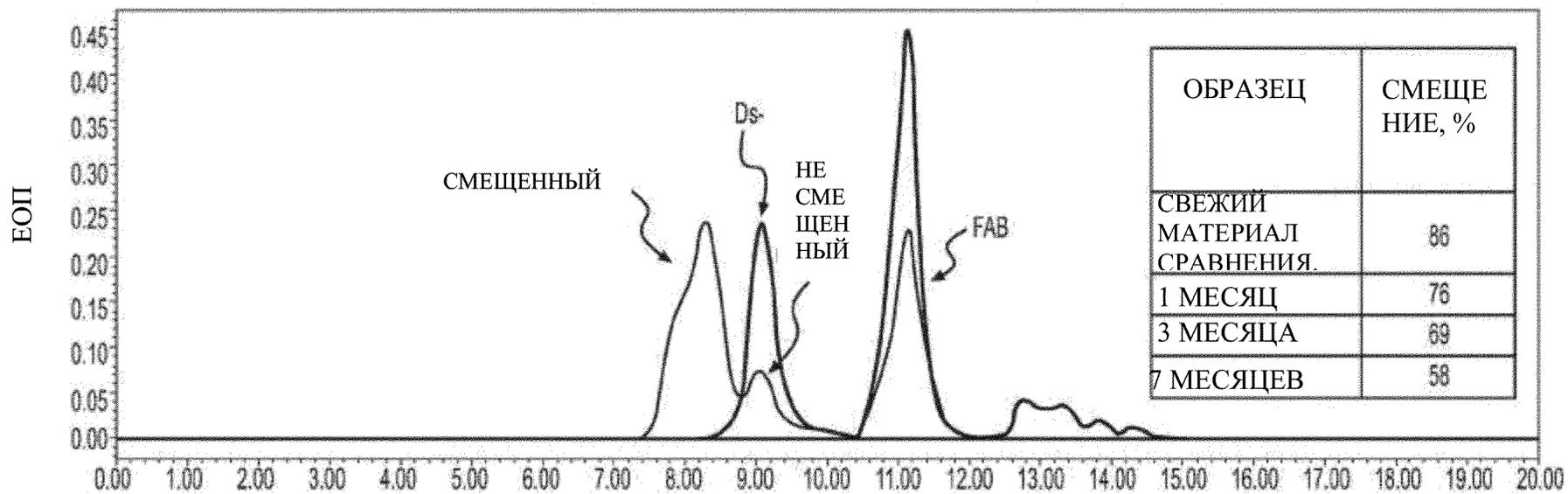
ФИГ. 3А



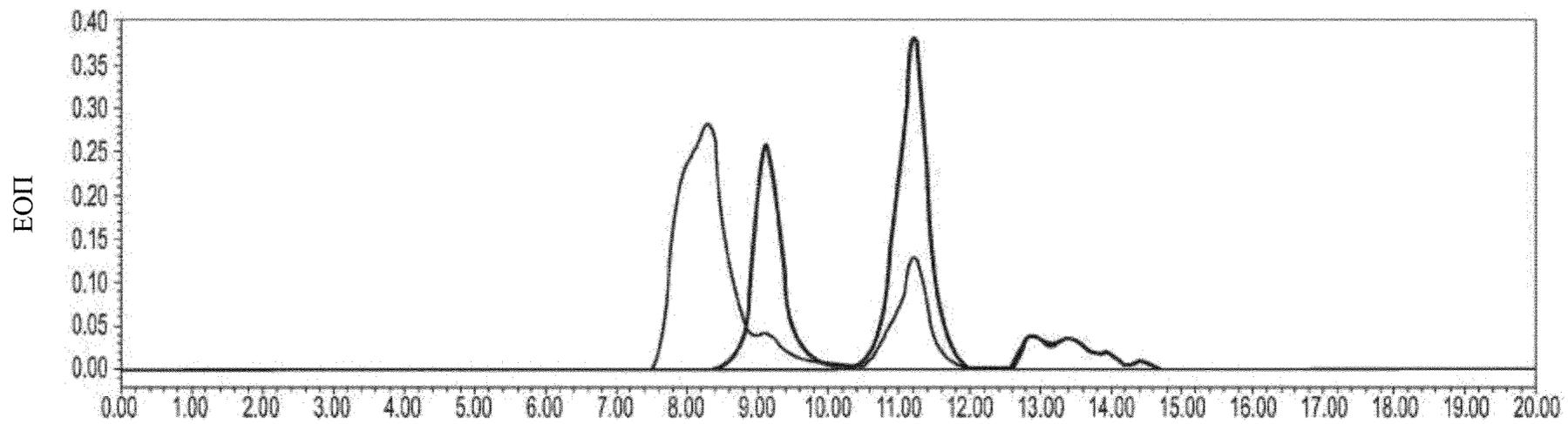
ФИГ. 3В



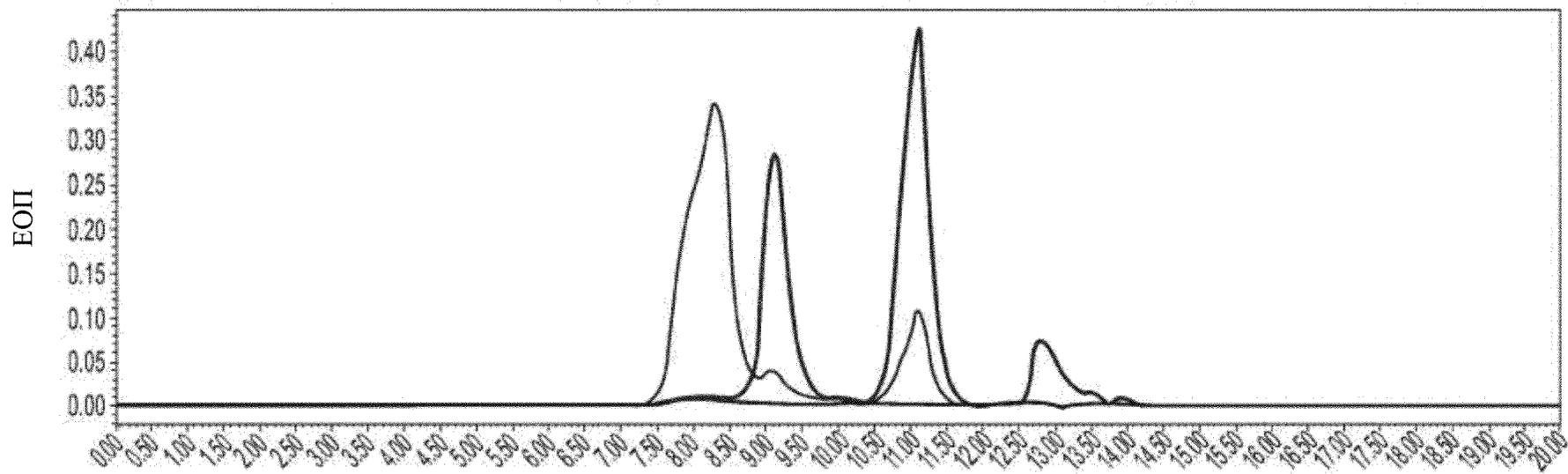
ФИГ. 4



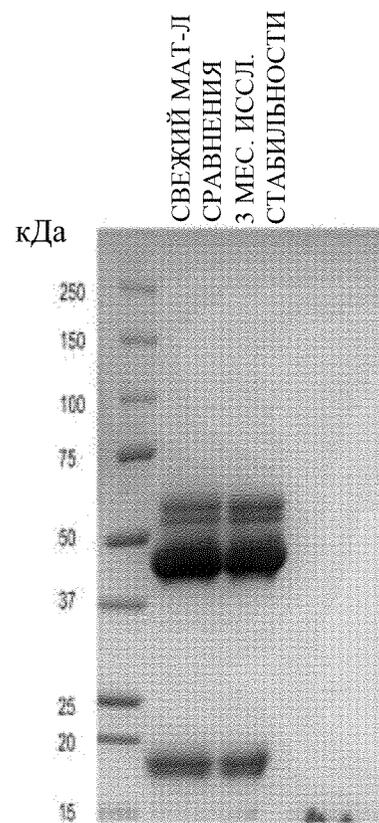
ФИГ. 5А



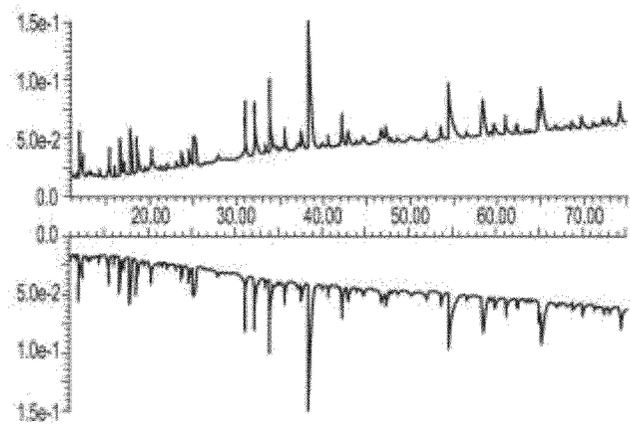
ФИГ. 5В



ФИГ. 5С

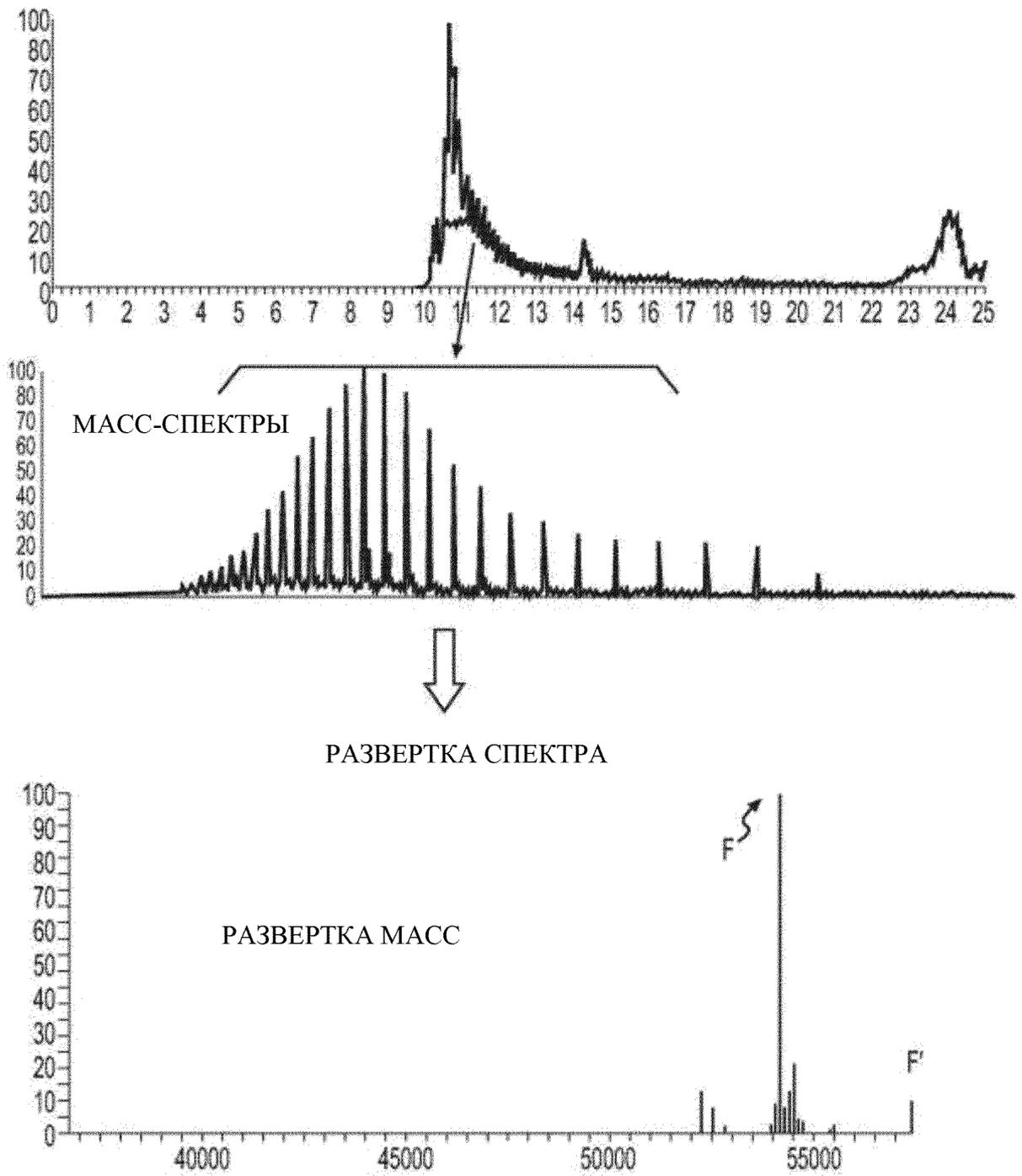


ФИГ. 6А

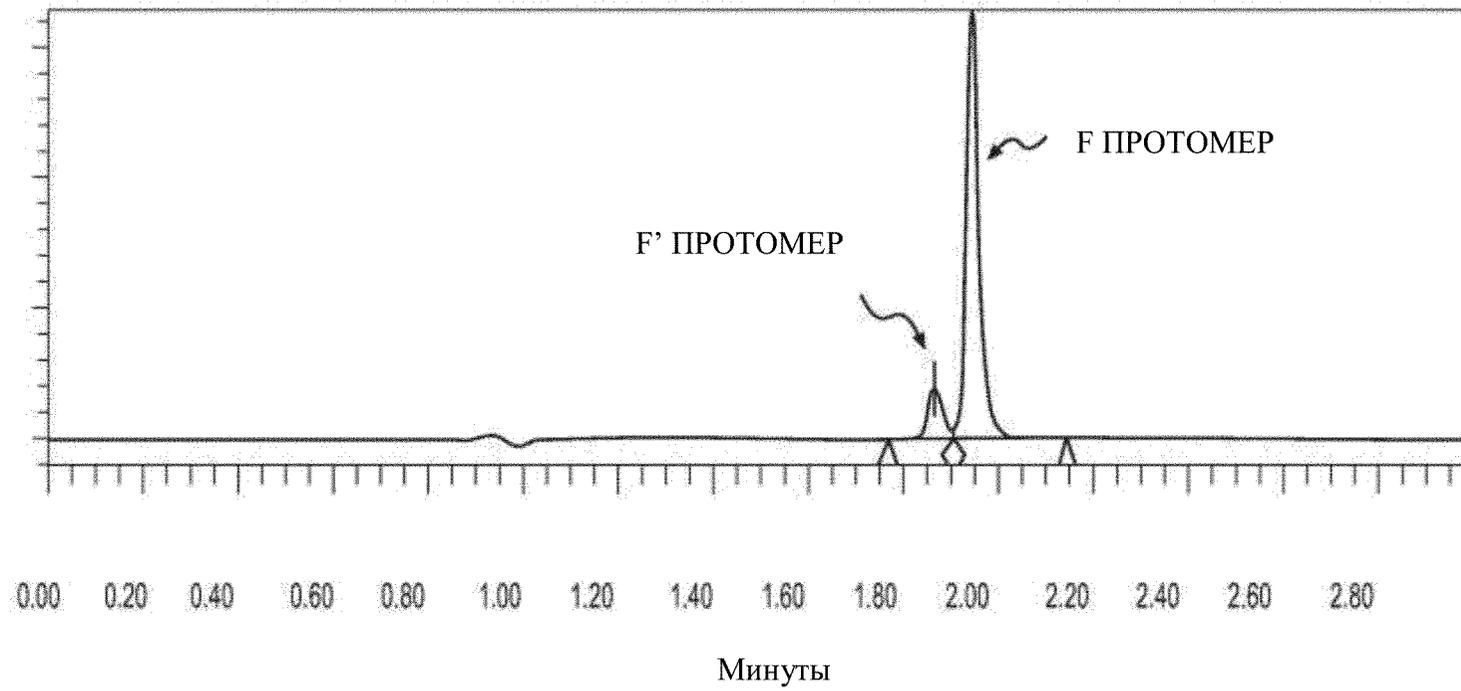


ВРЕМЯ

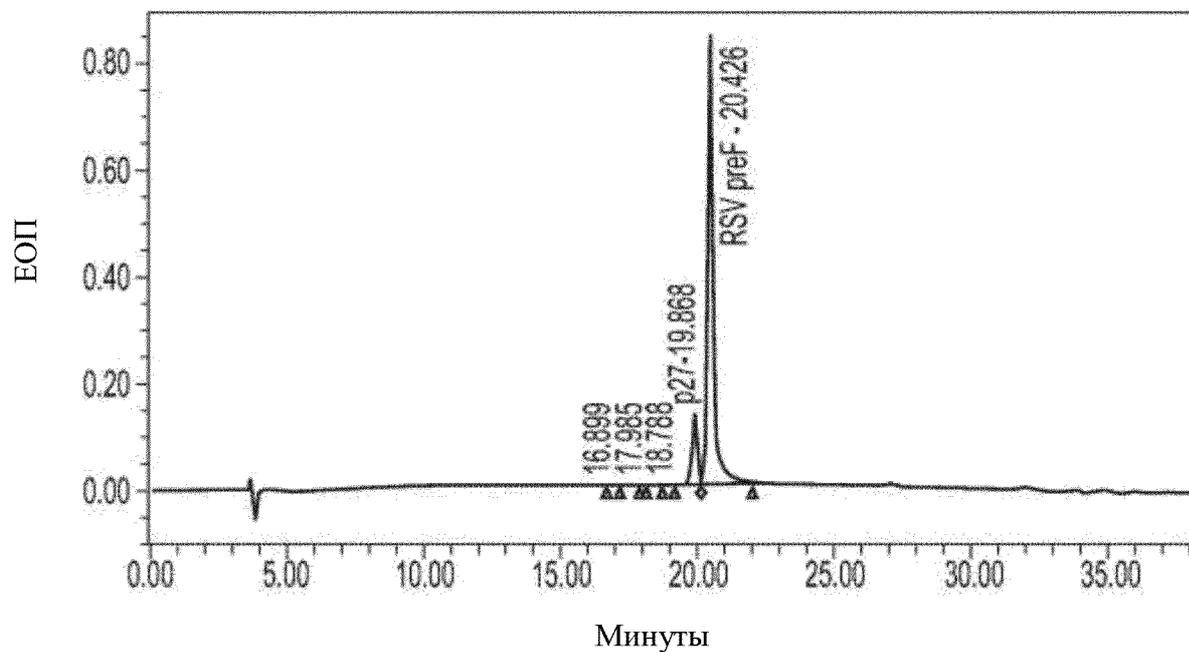
ФИГ. 6В



ФИГ. 7

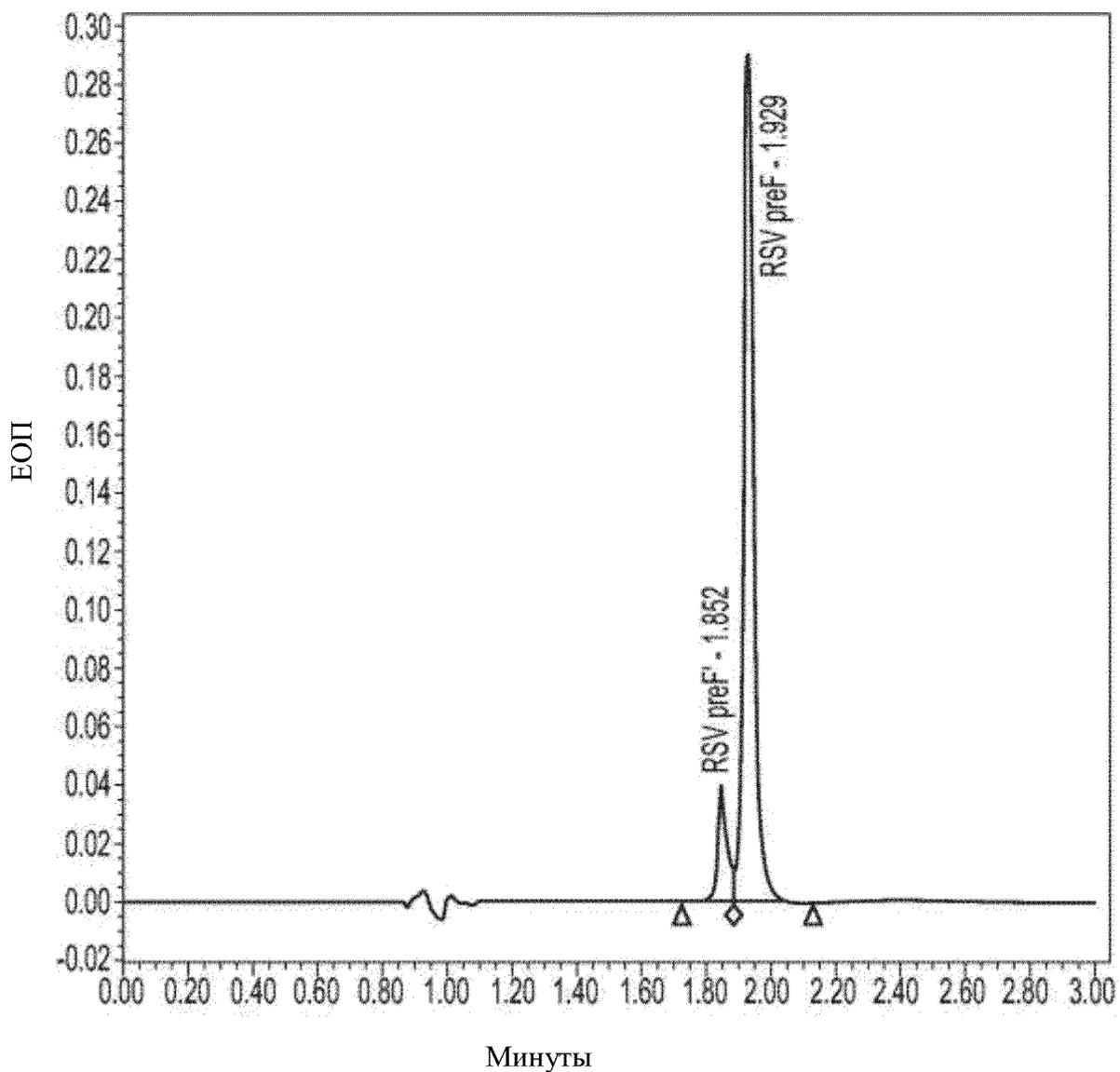


ФИГ. 8



	НАЗВАНИЕ ПИКА	ВУ	ПЛОЩАДЬ	ПЛОЩАДЬ %	ВЫСОТА	КОЛ-ВО	ЕД. ИЗМ.
1		16.899	19359	0.14	1220		
2		17.985	8731	0.06	1367		
3		18.788	7069	0.05	951		
4	p27	19.868	1683244	12.05	130859		
5	RSV preF	20.426	12249131	87.70	837893	15.000	МКТ

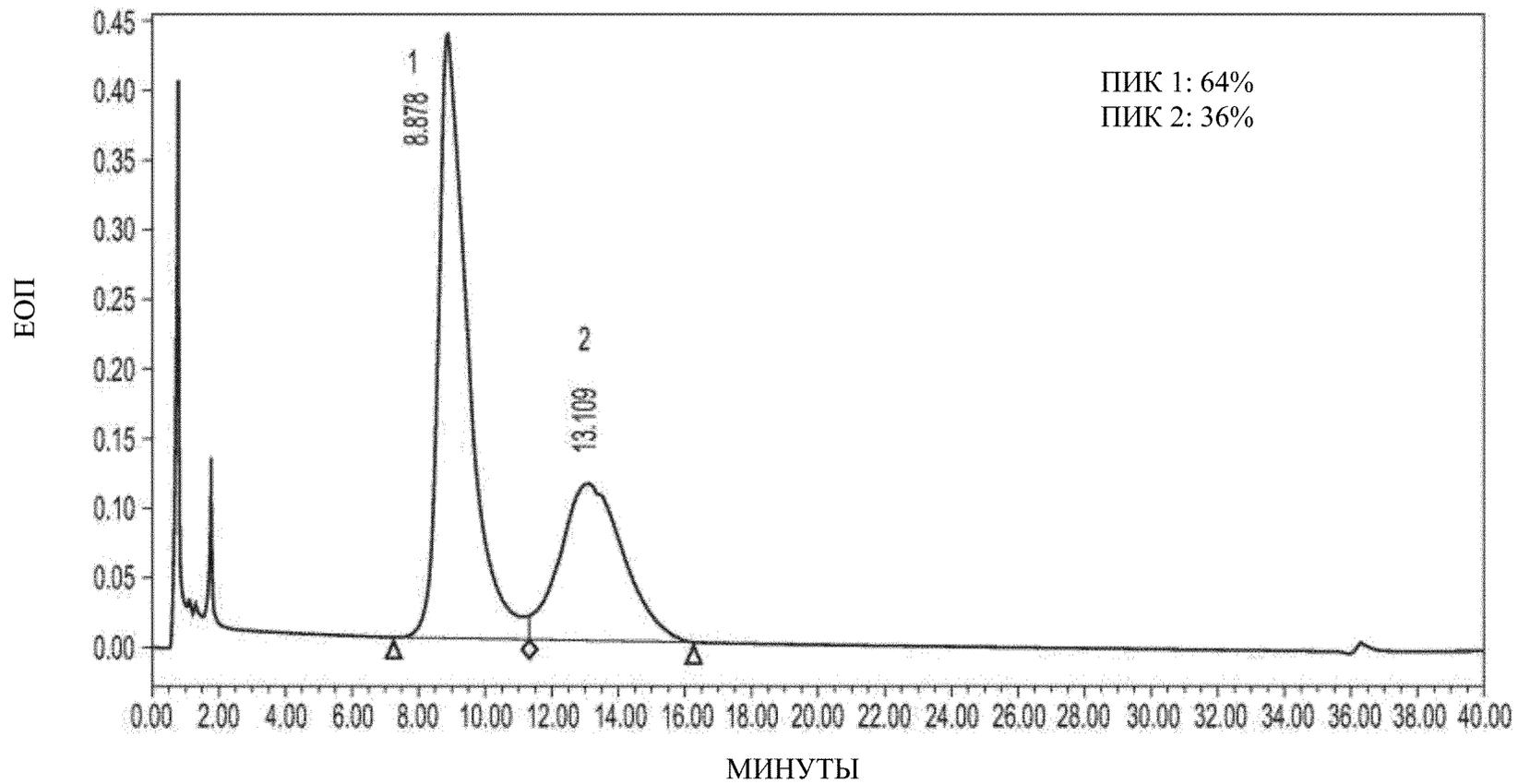
ФИГ. 9



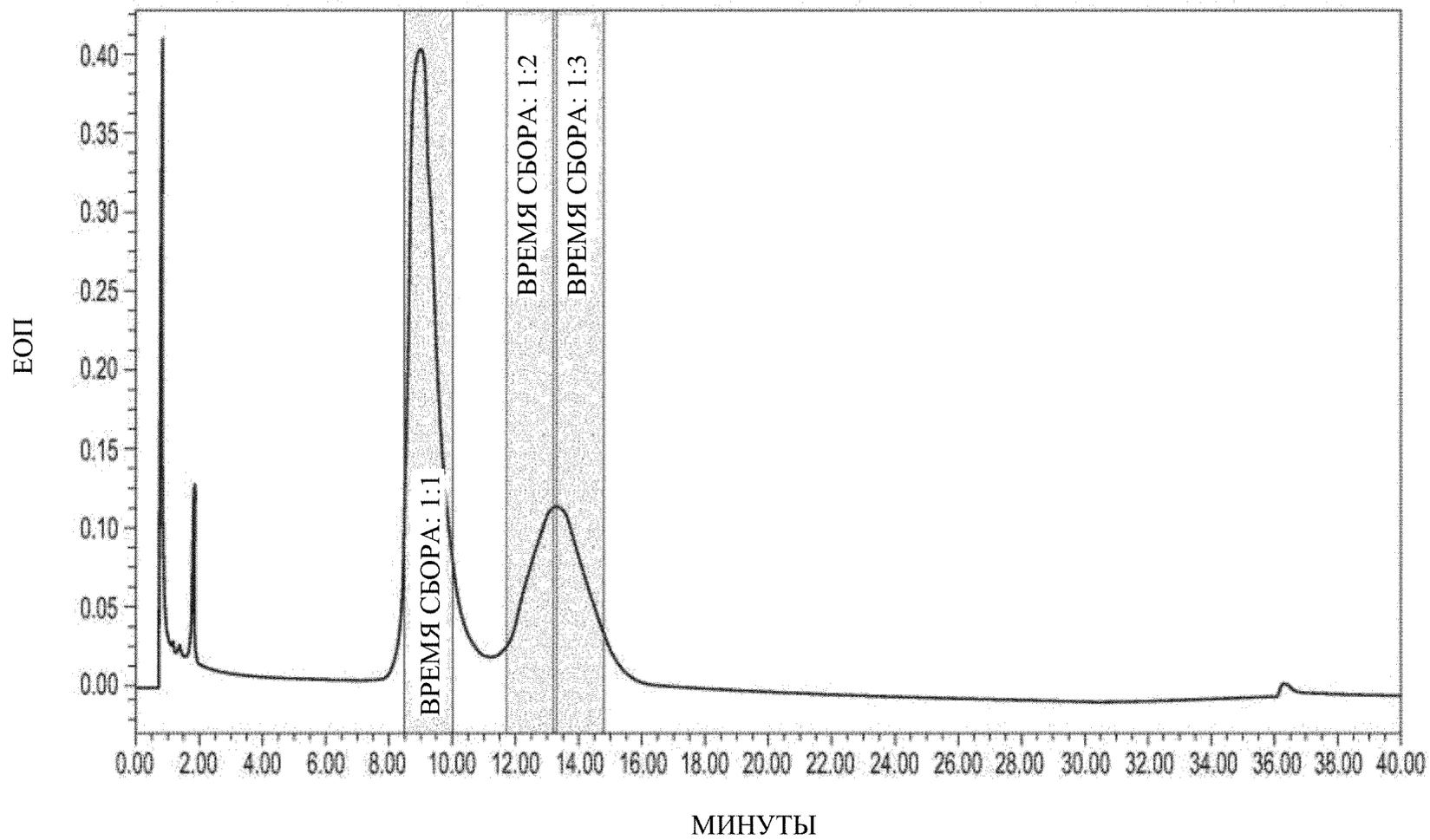
Название образца: стандартный образец (СО) 10 Канал: ФДМ канал 1, 280 нм при 4,8 нм

	НАЗВАНИЕ	ВРЕМЯ УДЕРЖИВА НИЯ, МИН	ПЛОЩАДЬ мкВ*с	ПЛОЩАДЬ %	ВЫСО ТА мкВ	КОЛ-ВО	ФАРМАКОПЕЯ США ЧИСЛО ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ТАРЕЛОК
1	RSV PREF'	1.852	87830	12.26	36513		1.396950e+004
2	RSV PREF	1.929	628321	87.74	286280	10.000	2.019141e+004
3			716151	100.00	322793		

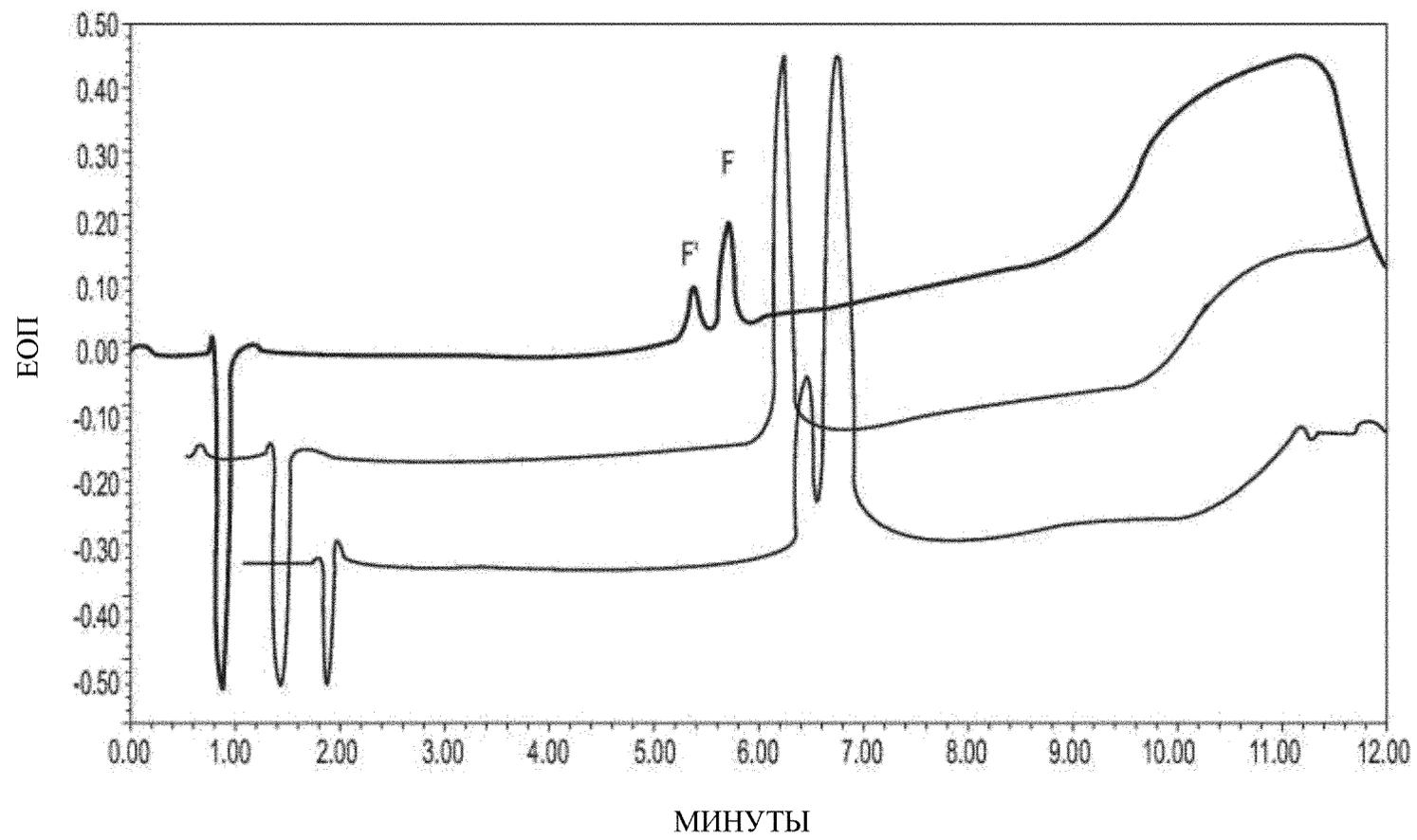
ФИГ. 10



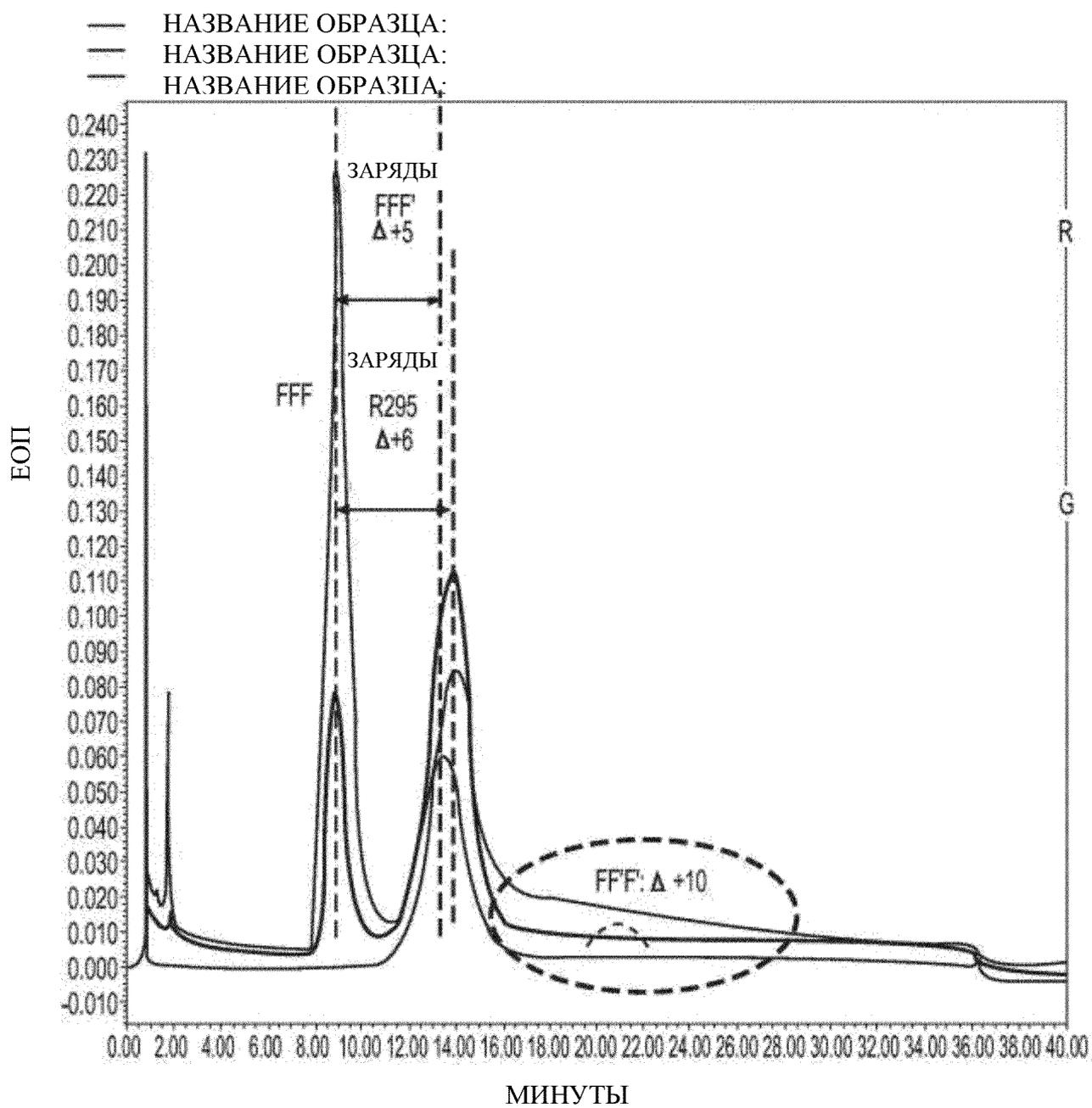
ФИГ. 11



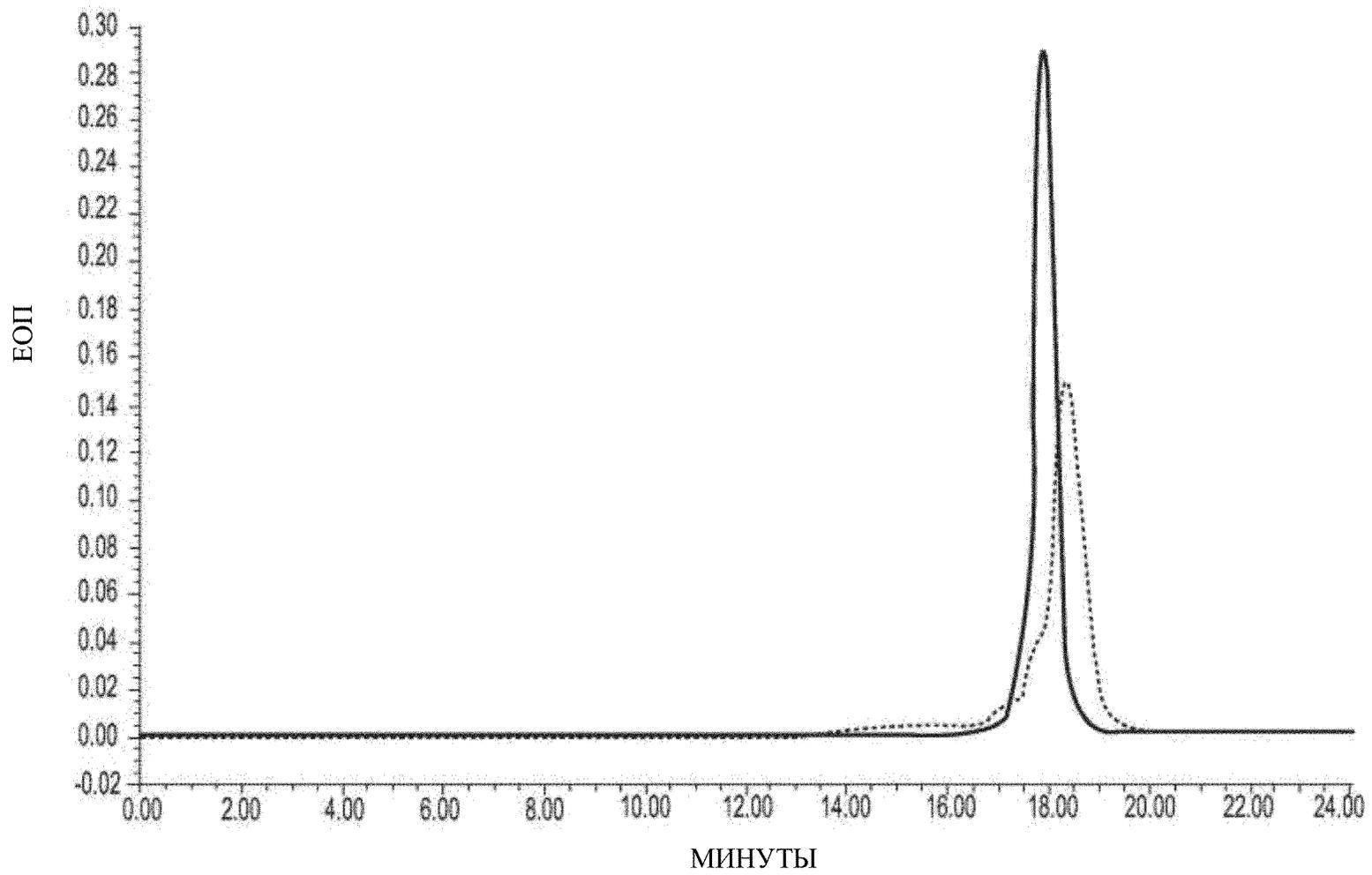
ФИГ. 12



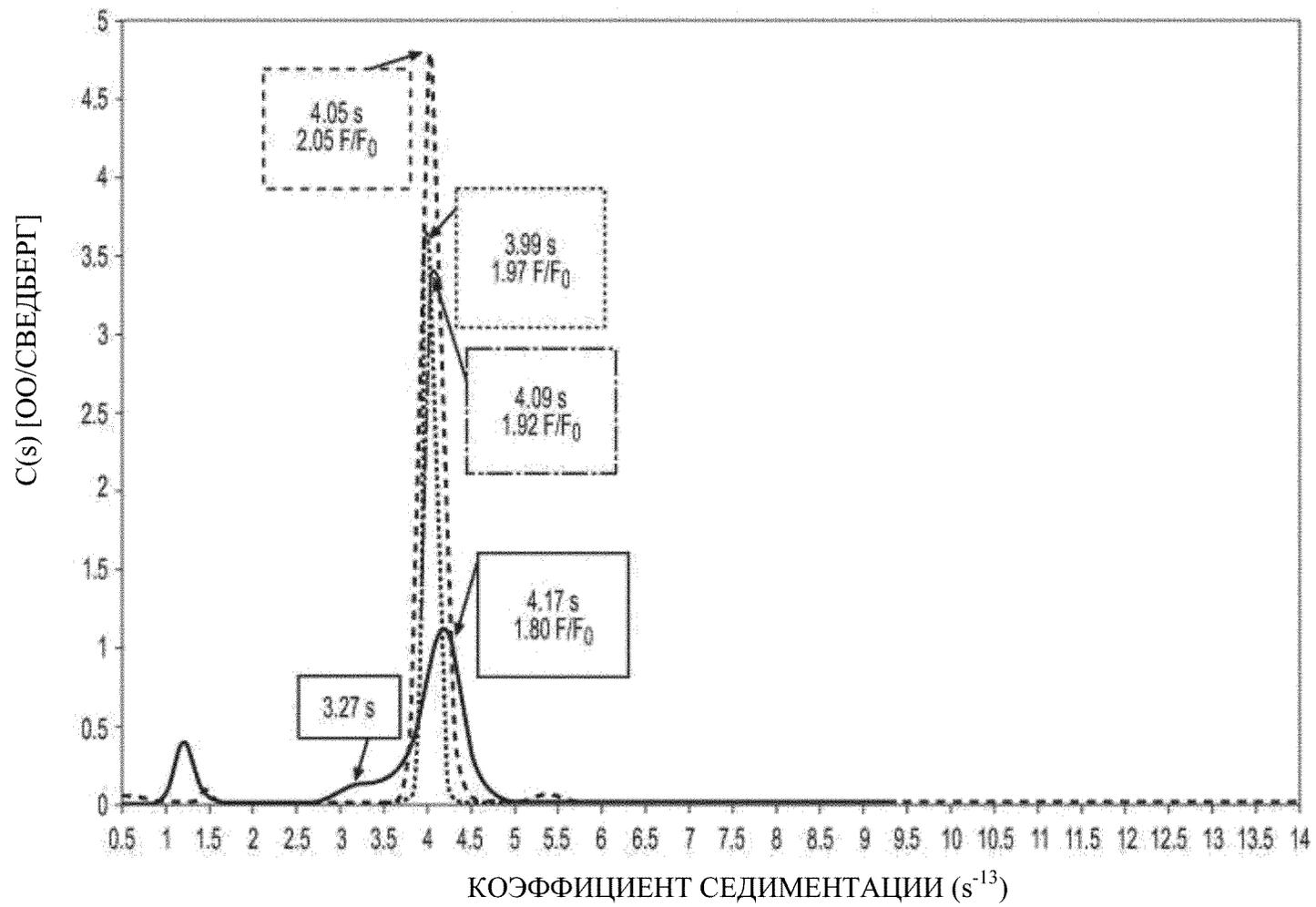
ФИГ. 13



ФИГ. 14

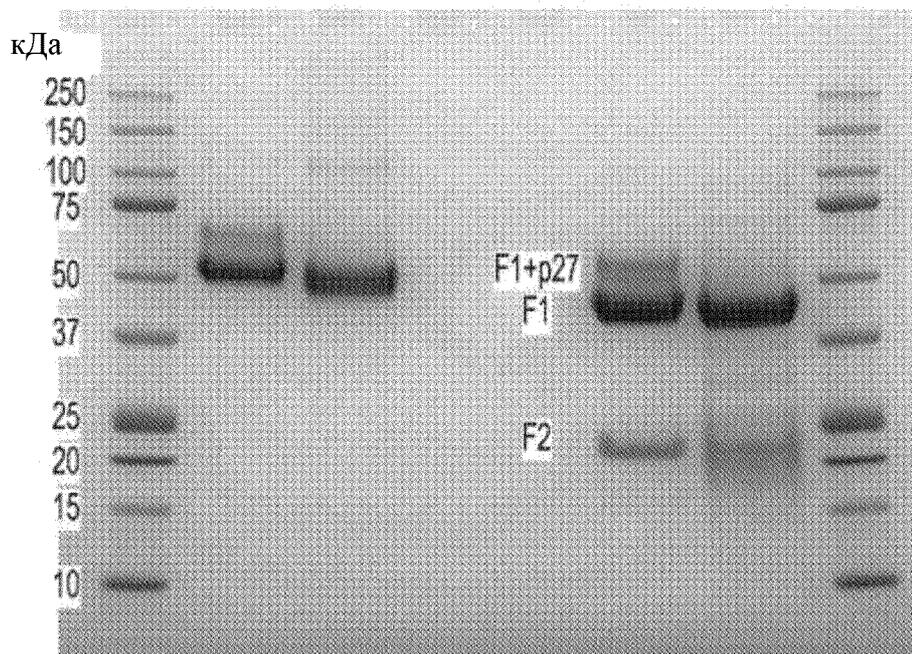


ФИГ. 15

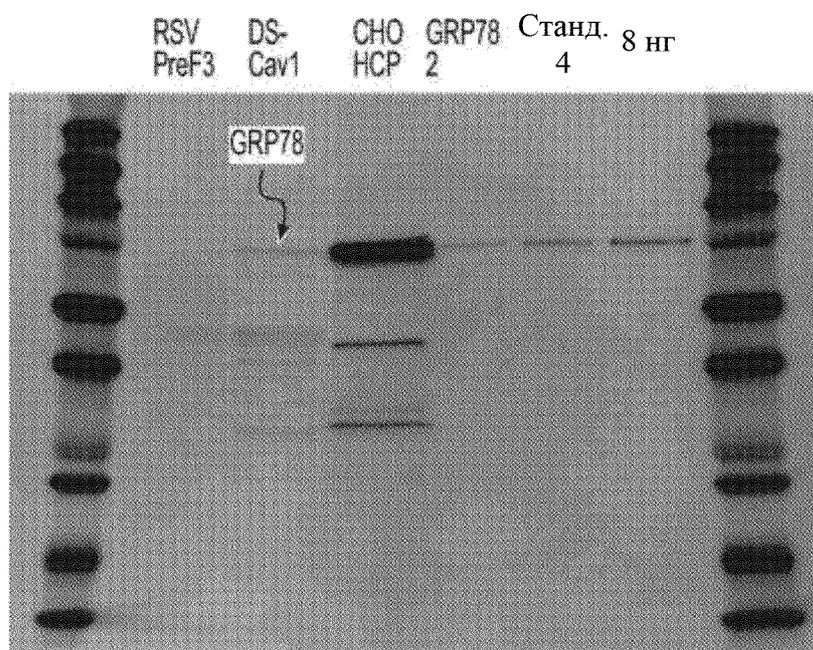


ФИГ. 16

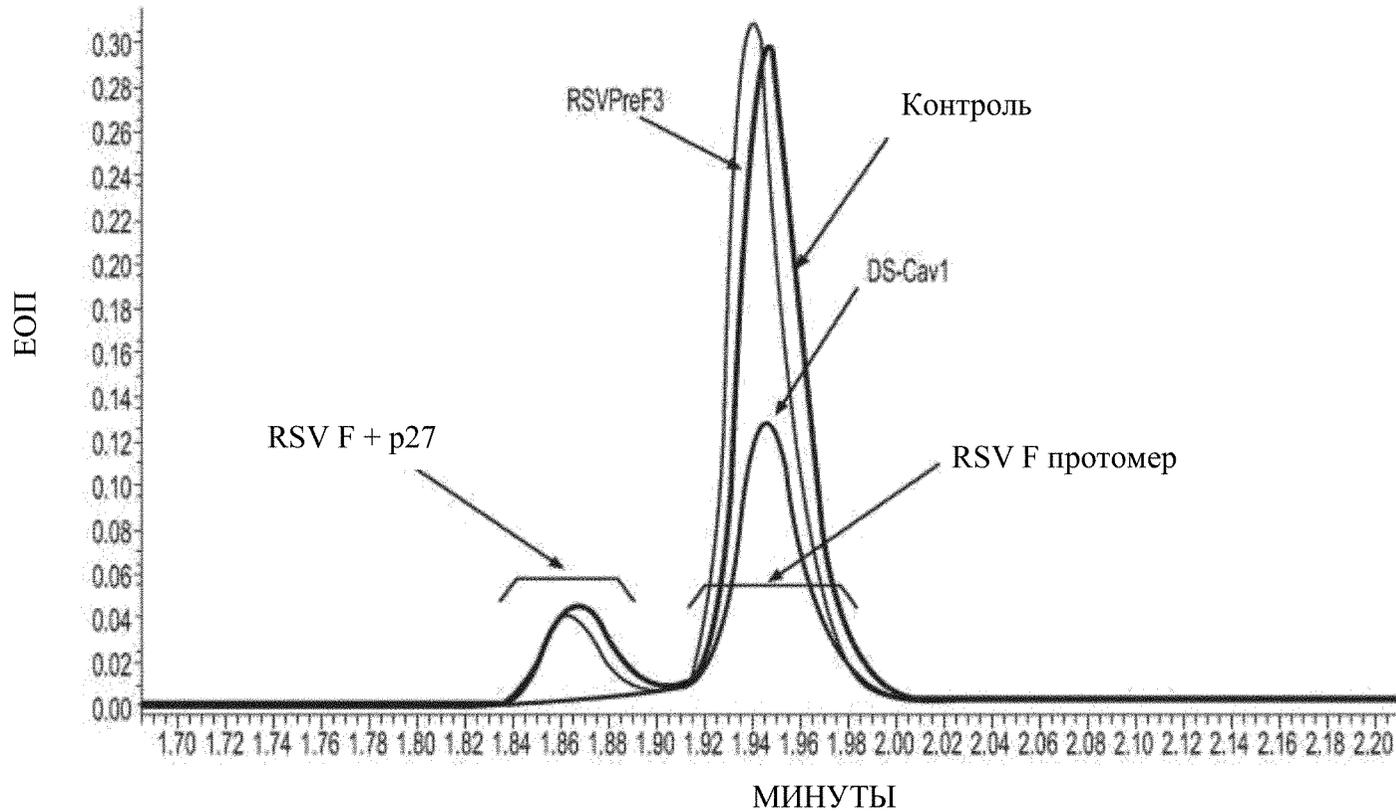
НЕВОССТАНАВЛИВА ВОССТАНАВЛИВАЮ
ЮЩИЕ УСЛОВИЯ ЩИЕ УСЛОВИЯ



ФИГ. 17А

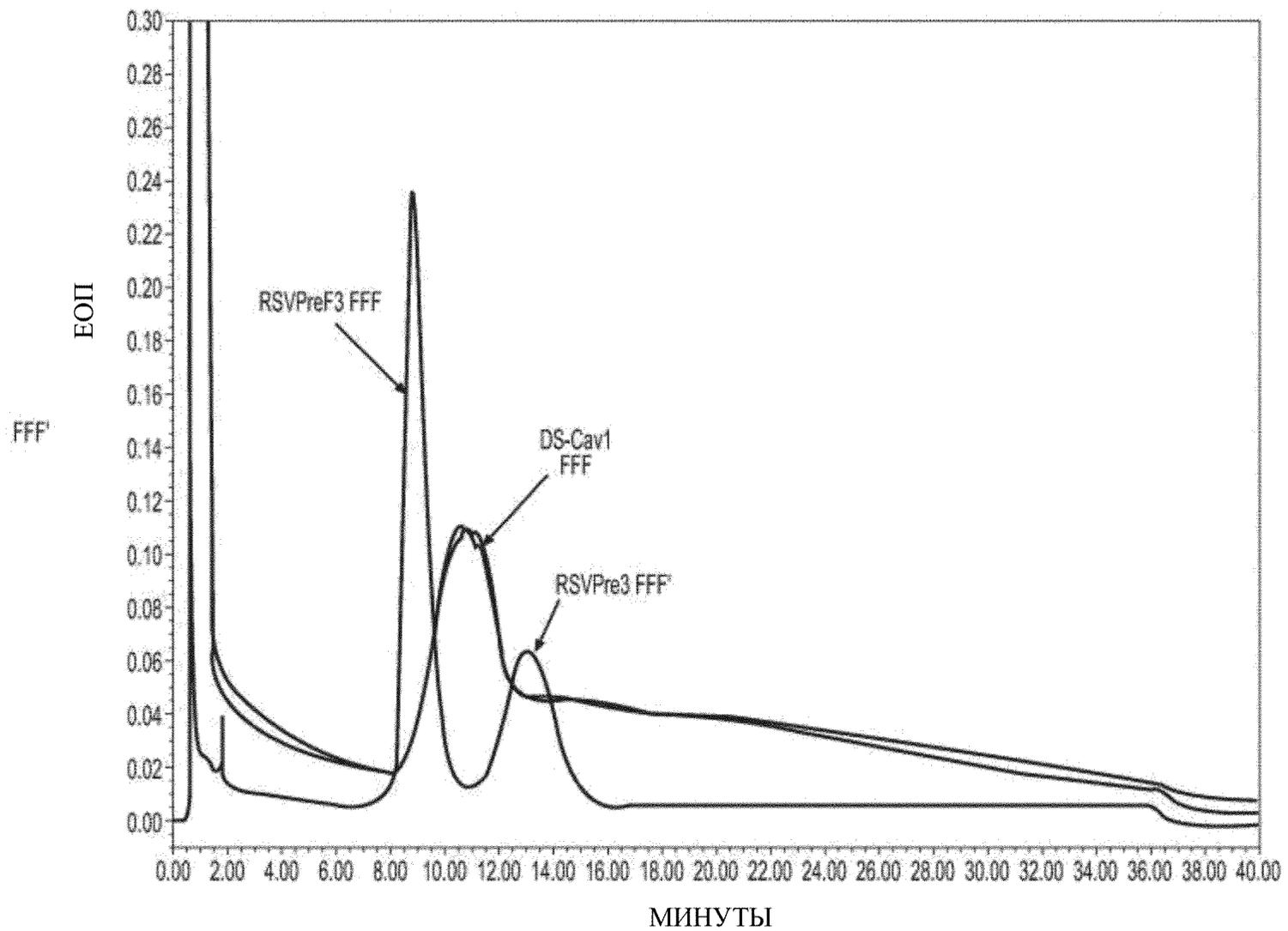


ФИГ. 17В

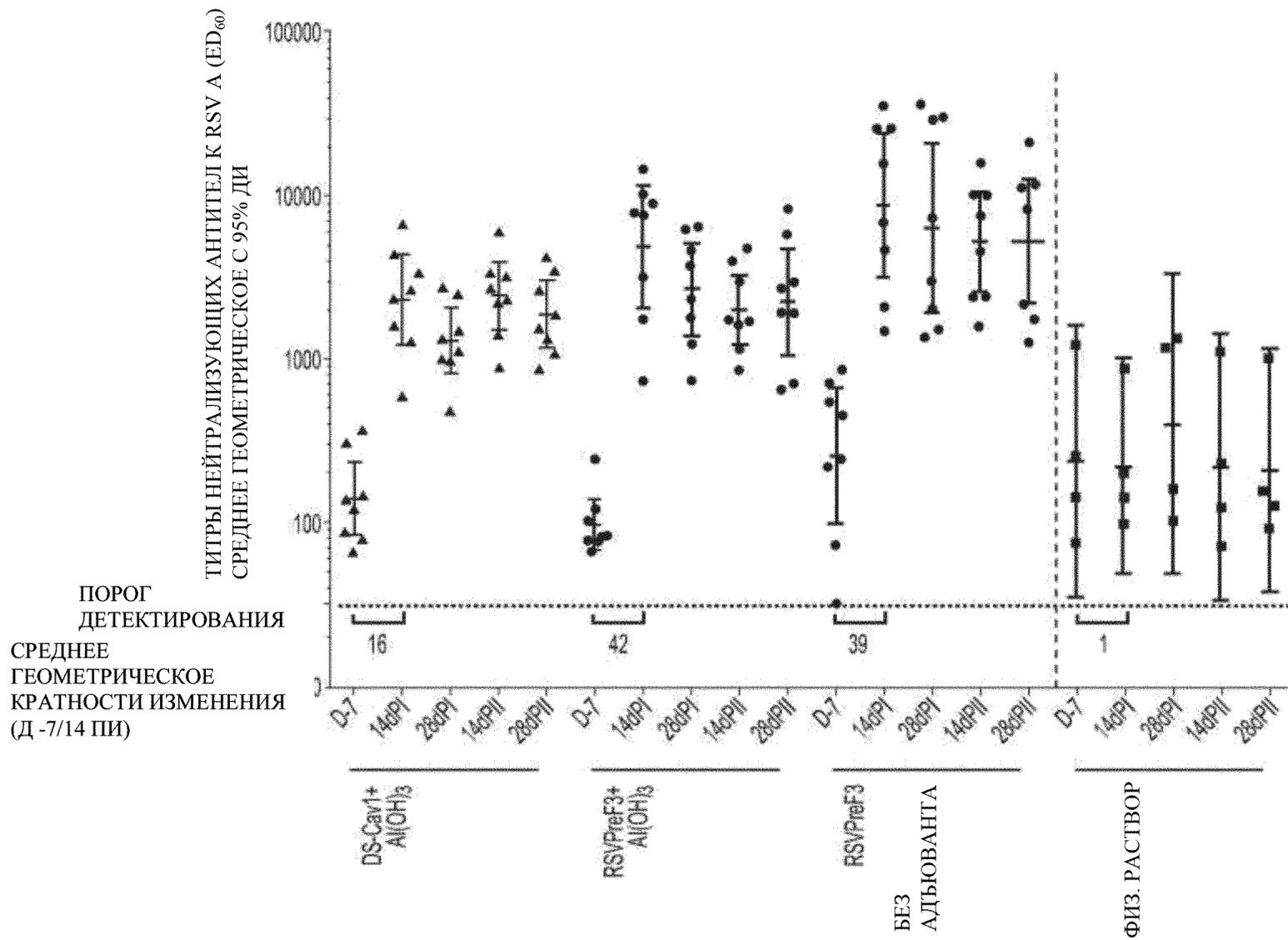


- Название образца: Контроль 10 Канал: ФДМ канал 1, 280 нм при 4,8 нм Дата сбора данных: понедельник 27.11.2017 19:08:51 СВВ -5,00
- Название образца: AD17-0066-1 NH DS-Cav1 Канал: ФДМ канал 1, 280 нм при 4,8 нм Дата сбора данных: понедельник 27.11.2017 19:17:08 СВВ -5,00
- Название образца: AD17-0066-1 GMP DS 250C007001 Канал: ФДМ канал 1, 280 нм при 4,8 нм Дата сбора данных: понедельник 27.11.2017 19:24:08 СВВ -5,00

ФИГ. 18

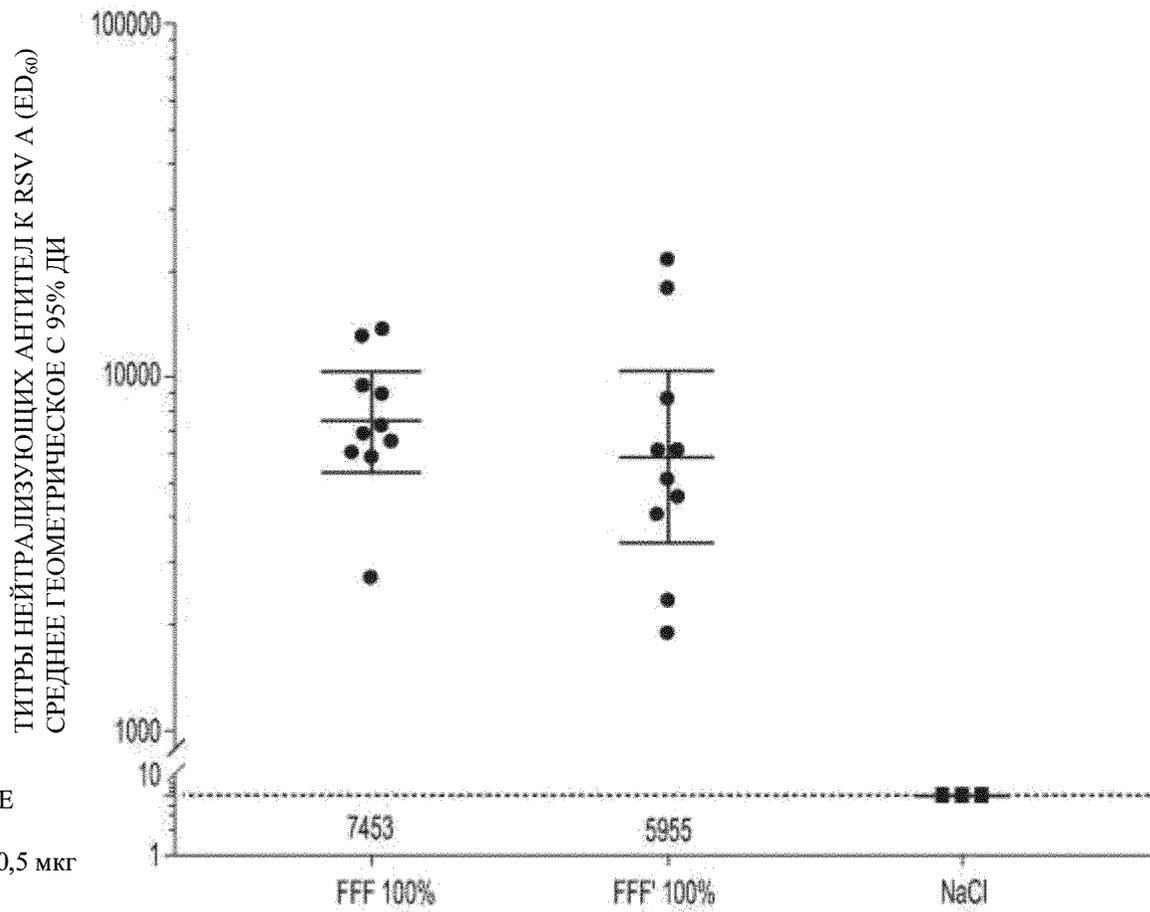


ФИГ. 19

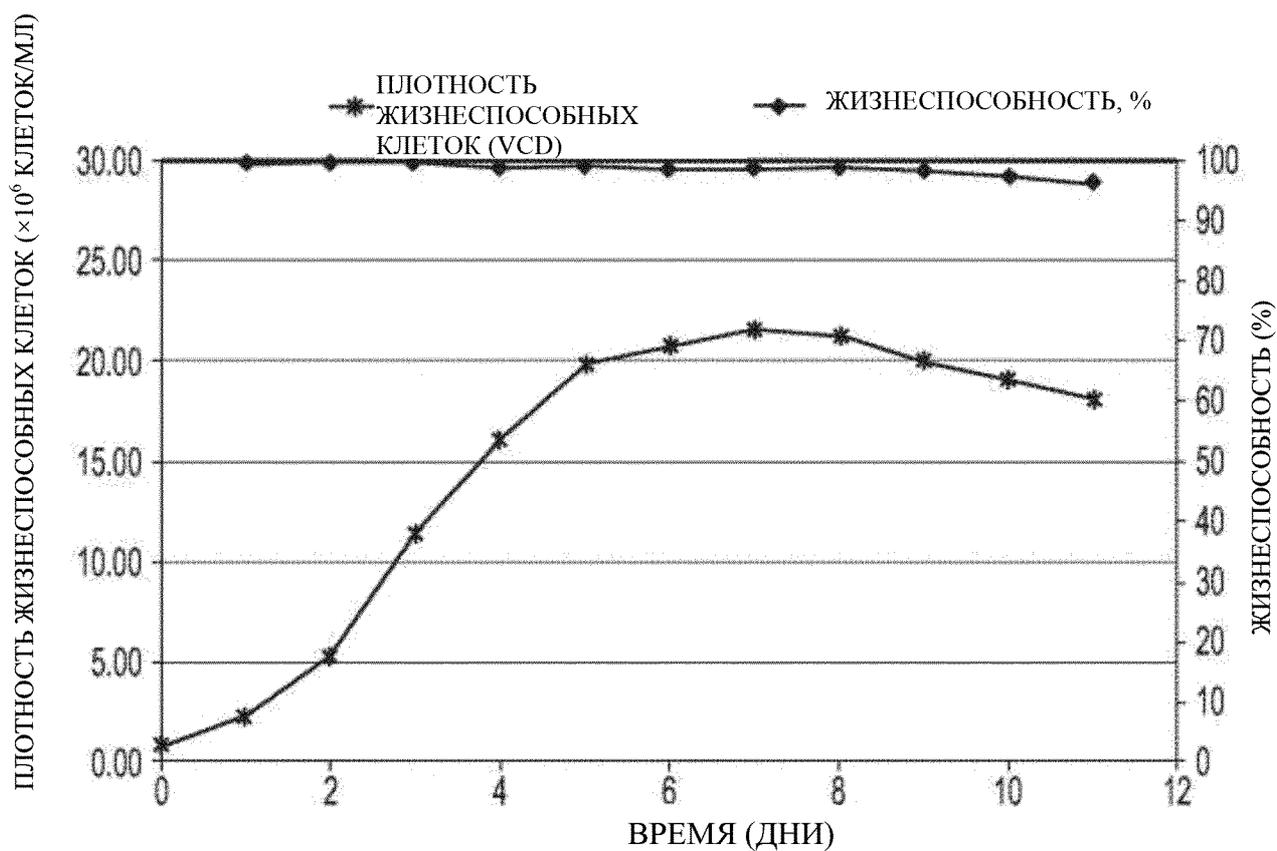


ФИГ. 20

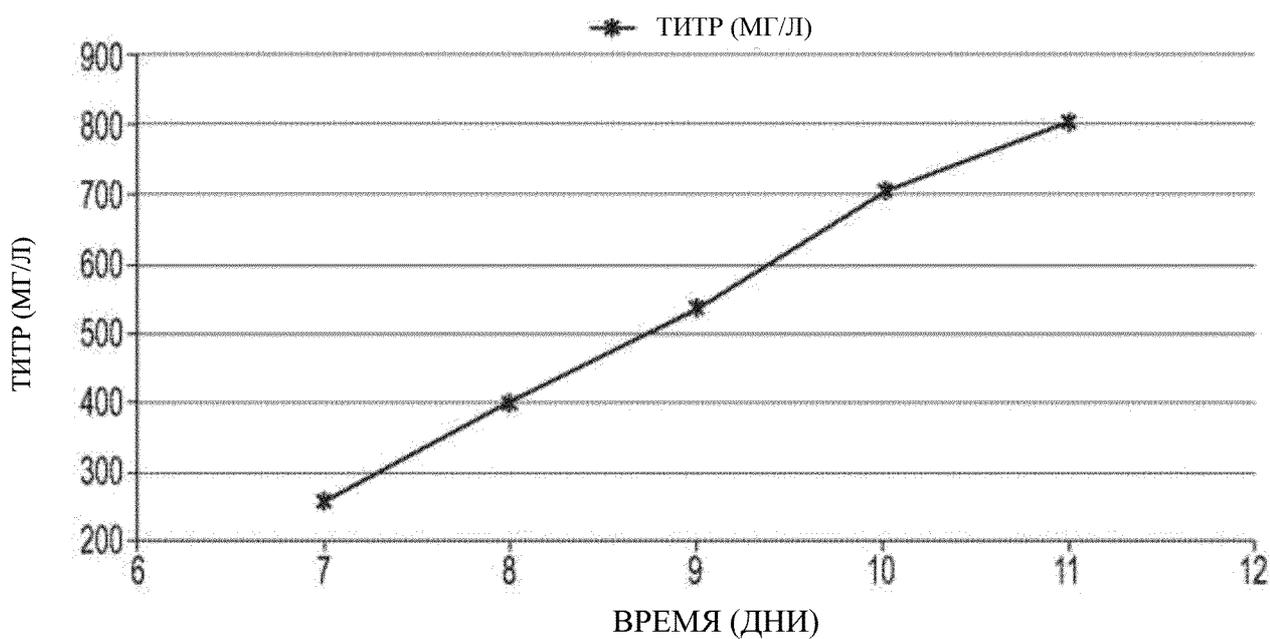
СРЕДНЕЕ
ГЕОМЕТРИЧЕСКОЕ
ДОЗА АНТИГЕНА 0,5 мкг



ФИГ. 21



ФИГ. 22А



ФИГ. 22В