

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190522** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.05.25

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)
C07K 14/08 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.08.13

(54) **СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ ТРИМЕРЫ ГЛИКОПРОТЕИНА ФИЛОВИРУСА**

(31) 18188675.5

(32) 2018.08.13

(33) EP

(86) PCT/EP2019/071732

(87) WO 2020/035497 2020.02.20

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

(72) Изобретатель:
**Лангедейк Йоханнес Петрус Мария,
Рюттен Люси, Блокланд Свен (NL)**

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

(57) Изобретение относится к мутациям гликопротеина филловируса, которые стабилизируют тримерную форму гликопротеина. Гликопротеины филловируса имеют определенные аминокислотные замены в указанных положениях последовательности гликопротеина. Гликопротеины филловируса, описанные в настоящем изобретении, характеризуются увеличенной процентной долей образования тримера и/или увеличенным выходом тримера по сравнению с гликопротеином филловируса, который не содержит одной или более из указанных аминокислотных замен. Также изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты и векторам, кодирующим гликопротеины филловируса, а также композициям, содержащим гликопротеины филловируса, кодирующую их нуклеиновую кислоту и векторы на ее основе.

A1

202190522

202190522

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566770EA/032

СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ ТРИМЕРЫ ГЛИКОПРОТЕИНА ФИЛОВИРУСА

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Вирусы Эбола, такие как вирус Эбола Заир (EBOV) и вирус Эбола Судан (SUDV), а также близкородственный им вирус Марбург (MARV), связаны со вспышками высоколетальной геморрагической лихорадки Эбола (EHF) у людей и приматов в Северной Америке, Европе и Африке. Данные вирусы относятся к семейству филовирусов, известному своей способностью вызывать инфекционные заболевания у людей и приматов, отличных от человека, характеризующиеся тяжелыми последствиями для здоровья, включающими летальный исход. Инфекции, вызываемые филовирусами, обуславливают летальность у людей, составляющую вплоть до 90%. Инфицирование EBOV, SUDV и MARV вызывает развитие EHF, при которой летальный исход часто наступает в период от 7 до 10 дней с момента начала заболевания. EHF характеризуется острым фебрильным синдромом, выражающимся в виде внезапно развивающейся лихорадки, тошноты, рвоты, диареи, пятнисто-папулезной сыпи, чувства дискомфорта, общей слабости, генерализованных признаков повышенной сосудистой проницаемости, нарушения свертываемости крови и нарушения регуляции врожденного иммунного ответа. Большая часть проявлений заболевания, по всей видимости, обусловлена нарушением регуляции видов врожденного иммунного ответа на инфекцию и репликацией вируса в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов, что обуславливает гибель клеток-хозяев и разрушение эндотелиального барьера. Филовирусы могут распространяться воздушно-капельным путем или посредством прямого контакта с зараженной кровью, органами и биологическими жидкостями человека или ННР. Сообщалось, что инфицирование одним вирионом является достаточным, чтобы вызвать геморрагическую лихорадку Эбола (EHF) у человека. В настоящий момент не существует одобренного терапевтического средства или вакцины для лечения или предупреждения EHF. Поддерживающая терапия остается единственным одобренным видом медицинского вмешательства в отношении индивидуумов, подвергшихся заражению филовирусами.

Будучи причиной развития тяжелого заболевания у человека, филовирусы продолжают вызывать беспокойство, как в качестве источника естественной инфекции, так и в качестве возможных средств для биотерроризма. Резервуар филовирусов в дикой природе все еще не является окончательно определенным. Были описаны четыре подтипа вирусов Эбола, вызывающих EHF, т. е. те подтипы, которые были причиной случаев заболевания в Заире, Судане, Бундибугио и на Берегу Слоновой Кости (Sanchez, A. et al. 1996 PNAS США 93:3602-3607). Данные подтипы вирусов Эбола характеризуются похожим строением генетических структур, например, они представляют собой вирусы с нитью РНК с отрицательной полярностью, геном которых содержит семь линейно расположенных генов. Продукты структурных генов включают, например, гликопротеин вирусной оболочки, существующий в двух альтернативных

формах - секретлируемый растворимый гликопротеин (ssGP) и трансмембранный гликопротеин (GP), вырабатываемый путем редактирования РНК, который опосредует проникновение вируса (Sanchez, et al. 1996 PNAS USA 93:3602-3607).

Предполагается, что иммунизация может быть применимой для защиты от инфекции, вызываемой вирусом Эбола, поскольку в пределах подтипов вируса Эбола наблюдается меньший уровень нуклеотидного полиморфизма, чем среди других РНК-вирусов (Sanchez et al. 1996 PNAS США 93:3602-3607). До настоящего момента действия по разработке профилактических вакцин против филовирусов приводили к различным результатам, отчасти из-за того, что требования для развития видов защитного иммунного ответа на инфекции, вызываемые филовирусом, являются плохо понятными. Более того, большое количество филовирусов, циркулирующих в пределах естественных резервуаров, усложняют задачу по разработке вакцины, способной защитить от всех видов филовирусов.

Кандидатные вакцины разрабатываются с применением технологий на основе разнообразных платформ, в том числе способных к репликации векторов (например, вирус везикулярного стоматита; вирус бешенства; вирус парагриппа); векторов, не способных к репликации (аденовирус, модифицированный вирус осповакцины Анкара); белковые субъединицы, включая вирусоподобные частицы, экспрессируемые в бактериальных клетках, клетках насекомых, клетках млекопитающих, клетках растений; вакцин на основе ДНК; и /или живого или убитого аттенуированного филовируса (Friedrich et al., *Viruses*. 2012 Sep;4(9):1619-50). Гликопротеин GP EBOV является необходимым компонентом вакцины, способной обеспечивать защиту от воздействия тех же видов EBOV. Кроме того, включение в состав вакцины GP из EBOV и SUDV, двух наиболее вирулентных видов вируса Эбола, способно обеспечивать защиту обезьян от воздействия EBOV и SUDV при внутримышечном введении, а также от воздействия отдаленно родственных видов Бундибугио (BDBV), Леса Таи (TAFV; ранее известного как Берег Слоновой Кости или Кот-д'Ивуар) вируса Эбола. Таким же образом, включение в состав вакцины GP из MARV способно обеспечивать защиту обезьян от воздействия MARV при внутримышечном и воздушно-капельном введении. Разработка медицинских мер противодействия таким вирусам имеет высокий приоритет, в частности, разработка пан-филовирусной вакцины - единой вакцины, способной обеспечивать защиту от всех патогенных филовирусов.

Ген гликопротеина (GP) вируса Эбола кодирует предшественник секретлируемого гликопротеина (pre-sGP), неструктурный секретлируемый гликопротеин ssGP небольшого размера и GP, экспрессируемый на поверхности. ssGP, который представляет собой первичный продукт гена GP, секретлируется, однако не распознается нейтрализующими вирусом mAb к GP, в отличие от GP, экспрессируемого на поверхности. GP, экспрессируемый на поверхности, состоит из GP1 и GP2, соединенных вместе с помощью естественной дисульфидной связи. GP1 состоит из основной части и следующих за ней гликановой шапочки и муциноподобного домена. GP2 содержит трансмембранный

участок. На фиг. 1 представлено схематическое изображение структуры гена GP филовirusа, экспрессируемого на поверхности, на котором показано головной домен GP1 (обозначен черным цветом), который содержит муциноподобный домен (обозначен серым цветом), и домен GP2, который содержит участок рефолдинга 1 (RR1), основная спираль (между RR1 и RR2), участок рефолдинга 2 (RR2) и трансмембранный домен (TM).

Подобно другим вирусным белкам слияния, GP вируса Эбола представляет собой динамический аппарат по осуществлению слияния, который запускает слияние мембран посредством необратимого рефолдинга белка из метастабильной конформации до слияния в стабильную конформацию после слияния. Метастабильная конформация до слияния представляет собой тример, состоящий из трех GP1 и трех GP2.

Было определено целый ряд кристаллических структур и EM-структур для GP вируса Эбола, экспрессируемых в клетках насекомых (Wang et al. Cell. 2016 Jan 14;164(1-2):258-268, Vornholdt et al. MBio. 2016 Feb 23;7(1):e02154-15, Pallesen et al. Nat Microbiol. 2016 Aug 8;1(9):16128) и клетках HEK293, однако два из тех, которые вырабатываются в клетках HEK293, содержат мотив тримеризации либо фибритина, либо GCN4. Только одна из структур тримера не была слита с гетерологичным доменом тримеризации (Lee et al. Nature. 2008 Jul 10;454(7201):177-82). Цель данного исследования состояла в получении высококачественных растворимых тримеров GP вируса Эбола в конформации до слияния, экспрессируемых в клетках млекопитающих без гетерологичного домена тримеризации. Растворимый GP на основе эктодомена образует в основном димеры и мономеры при экспрессии в клетках HEK293T (Lee et al. Nature. 2008 Jul 10;454(7201):177-82 доп. фиг. 8).

Для разработки вакцины предпочтительным является применение гликопротеинов, способных индуцировать выработку bNAbs. Однако большинство bNAbs распознают только нативную конформацию GP до того, как он подвергается любым конформационным изменениям. Разработка стабильного GP в его подобной нативной компактной и закрытой конформации, при сведении к минимуму презентации ненативных и, следовательно, не обеспечивающих нейтрализацию эпитопов, могло бы, таким образом, увеличить эффективность выработки таких bNAbs. Предыдущие попытки получить стабильный гликопротеин были раскрыты, например, в международной заявке на патент PCT/EP2016/070654, где были описаны определенные стабилизирующие мутации гликопротеина филовirusа.

Однако все еще имеется необходимость в получении тримеров гликопротеина филовirusа с улучшенной стабильностью, которые характеризуются увеличенной процентной долей образования тримера и увеличенным выходом тримера. Является предпочтительным, чтобы такие стабилизированные тримеры гликопротеинов филовirusа также демонстрировали хороший уровень связывания с нейтрализующими антителами широкого спектра действия (bNAbs) и относительно ограниченный уровень связывания с нейтрализующими Ab, отличными от антител широкого спектра действия (антител, отличных от bNAbs). Целью настоящего изобретения является обеспечение GP филовirusа, которые характеризуются увеличенными значениями процентной доли

тримера и предпочтительно также увеличенными значениями выхода тримера.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Настоящее изобретение относится к рекомбинантным гликопротеинам филловируса, которые характеризуются увеличенной процентной долей образования тримера и/или увеличенными значениями выхода тримера по сравнению с ранее описанными тримерами GP филловируса. Процесс сворачивания гликопротеина оптимизирован таким образом, чтобы обеспечить большее сходство тримеров GP с нативной конфигурацией белка, и участки закрытой конформации до слияния, важные для осуществления процесса слияния, стабилизируются с помощью мутаций, описанных в данном документе. Это обеспечивает универсальный подход для оптимизации процесса сворачивания и стабильности тримеров GP филловируса. Полученные в результате этого стабильные и надлежащим образом свернутые тримеры GP филловируса, обладающие большим сходством с нативной конфигурацией белка, применимы для целей иммунизации, например для увеличения вероятности индуцирования выработки нейтрализующих антител широкого спектра действия и снижения вероятности индуцирования выработки ненейтрализующих и слабых нейтрализующих антител после введения рекомбинантных тримеров GP филловируса. Настоящее изобретение также относится к выделенным молекулам нуклеиновой кислоты и векторам, кодирующим рекомбинантные гликопротеины филловируса, клеткам, содержащим их, и композициям на основе рекомбинантного гликопротеина филловируса, молекулы нуклеиновой кислоты, вектора и/или клеток.

[0010] В одном общем аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантным белкам филловируса, содержащим определенные аминокислотные остатки в указанных положениях в последовательности GP, обеспечивающие стабилизацию при образовании тримеров.

[0011] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный гликопротеин филловируса по настоящему изобретению содержит незаряженный аминокислотный остаток в положении 588, при этом нумерация положений соответствует нумерации GP в изоляте Z/Zaire/Yambuku/1976/057935, и при этом незаряженный аминокислотный остаток не представляет собой цистеин.

[0012] В определенных предпочтительных вариантах осуществления указанный незаряженный аминокислотный остаток в положении 588 представляет собой гидрофобный аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из F, I, A, L, M, V, W и Y.

[0013] В определенных предпочтительных вариантах осуществления указанный незаряженный аминокислотный остаток в положении 588 представляет собой гидрофобный аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из F, I, L, M, V и Y.

[0014] В более предпочтительном варианте осуществления указанный гидрофобный аминокислотный остаток в положении 588 представляет собой F.

[0015] В определенных предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный гликопротеин филовируса по настоящему изобретению дополнительно содержит аминокислотный остаток Р в положении 577 и/или 579, при этом нумерация положений соответствует нумерации GP в изоляте Z/Zaire/Yambuku/1976/057935.

[0016] В определенных предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный GP филовируса по настоящему изобретению представляет собой GP из штамма, выбранного из группы, состоящей из штаммов Маинга, Макона, Киквит, Судан-Гулу и Марбург.

[0017] В определенных вариантах осуществления рекомбинантный GP филовируса по настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из

1) гликопротеина из штамма Маинга вируса Эбола Заир, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, или гликопротеина из штамма Маинга вируса Эбола Заир с делецией от аминокислотного остатка 320 до аминокислотного остатка 476, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; и

2) гликопротеина GP из штамма Макона вируса Эбола Заир, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, или гликопротеина GP из штамма Макона вируса Эбола Заир с делецией от аминокислотного остатка 314 до аминокислотного остатка 472, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14; и

3) гликопротеина из штамма Киквит вируса Эбола Заир, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, или гликопротеина из штамма Киквит вируса Эбола Заир с делецией от аминокислотного остатка 314 до аминокислотного остатка 472, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23; и

4) гликопротеина вируса Марбург с делецией от аминокислотного остатка 255 до аминокислотного остатка 423, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27,

при этом нумерация положений соответствует нумерации GP в изоляте Z/Zaire/Yambuku/1976/057935.

[0018] В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к тримерному комплексу, содержащему нековалентно связанный олигомер, состоящий из трех рекомбинантных гликопротеинов филовируса по настоящему изобретению.

[0019] В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к частице, предпочтительно наночастице, например самособирающейся наночастице, на поверхности которой представлен рекомбинантный GP филовируса или тримерный комплекс по настоящему изобретению.

[0020] В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный GP филовируса по настоящему изобретению, и векторам, содержащим выделенную молекулу нуклеиновой

кислоты, функционально связанную с промотором. В одном варианте осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В другом варианте осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии. В одном предпочтительном варианте осуществления вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор.

[0021] Другой общий аспект относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, кодирующие рекомбинантный GP филовируса по настоящему изобретению. Такие клетки-хозяева можно применять для получения рекомбинантного белка, экспрессии рекомбинантного белка или получения вирусных частиц.

[0022] Другой общий аспект относится к способам получения рекомбинантного GP филовируса, включающим выращивание клетки-хозяина, содержащей выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, кодирующие рекомбинантный GP филовируса по настоящему изобретению, в условиях, подходящих для получения рекомбинантного GP филовируса.

[0023] Еще один общий аспект относится к композиции, содержащей рекомбинантный GP филовируса, тримерный комплекс, выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, вектор или клетку-хозяина, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0024] Еще один общий аспект настоящего изобретения относится к способу увеличения уровня образования тримера гликопротеина филовируса, где способ включает замену аминокислотного остатка в положении 588 последовательности гликопротеина на незаряженный аминокислотный остаток, при этом нумерация положений соответствует нумерации GP в изоляте Z/Zaire/Yambuku/1976/057935, и при этом незаряженный аминокислотный остаток не представляет собой цистеин.

[0025] В предпочтительном варианте осуществления способ увеличения уровня образования тримера гликопротеина филовируса дополнительно включает замену аминокислотного остатка в положении 577 и/или 579 последовательности гликопротеина на остаток Р, при этом нумерация положений соответствует нумерации GP в изоляте Z/Zaire/Yambuku/1976/057935.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0026] Вышеизложенное краткое описание, а также нижеследующее подробное описание настоящего изобретения будут более понятны при их рассмотрении в сочетании с прилагаемыми фигурами. Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, показанными на фигурах.

[0027] **ФИГ. 1.** Схематическое изображение структуры полноразмерного GP филовируса.

[0028] **ФИГ. 2.** Результаты анализа методом Blue Native PAGE для каркасной последовательности GP-T577P-T42A (FIL161615) с делецией муциноподобного домена из штамма Макона и мутантных вариантов. Все полосы содержали клеточные супернатанты, за исключением последней полосы, которая содержала очищенные тримеры,

обозначающей высоту, до которой проходит тример.

[0029] ФИГ. 3. Результаты аналитической SEC для супернатантов культуры клеток, содержащих GP с различными заменами. Пик тримера указан пунктирной линией, обозначенной словом "тример". Испытуемые замены представляли собой T577P, K588F и комбинацию T577P-K588F. Уровни экспрессии белка, которые измеряли с помощью аналитической SEC, представлены для каждой каркасной последовательности GP филовируса (прерывистая линия черного цвета) и вариантов с заменой T577P (прерывистая линия серого цвета), заменой K588F (сплошная линия черного цвета) и двойной заменой T577P+K588F (сплошная линия серого цвета). Замены испытывали в следующих каркасных последовательностях: А) GP из штамма Макона, В) GP из штамма Макона с делецией муциноподобного домена, С) GP из штамма Киквит, D) GP из штамма Киквит с делецией муциноподобного домена, Е) GP из штамма Маинга, F) GP из штамма Маинга с делецией муциноподобного домена. Уровни экспрессии белка в супернатантах культуры клеток испытывали через 72 ч. после трансфекции.

[0030] ФИГ. 4. Определение содержания тримеров на основании результатов аналитической SEC. Определение содержания тримеров проводили на основании значений высоты пика тримера, измеренных по хроматограммам аналитической SEC, представленным на ФИГ. 3. Испытуемые мутации представляли собой T577P, K588F и T577P-K588F. Мутации испытывали в следующих каркасных последовательностях: А) GP из штамма Макона, В) GP из штамма Макона с делецией муциноподобного домена, С) GP из штамма Киквит, D) GP из штамма Киквит с делецией муциноподобного домена, Е) GP из штамма Маинга, F) GP из штамма Маинга с делецией муциноподобного домена.

[0031] ФИГ. 5. Биослойная интерферометрия с применением антитела 100. Фиг. 5А) Один пример (GP из штамма Киквит) кривых, полученных в ходе биослойной интерферометрии с помощью Octet, где звездочкой на точечной линии обозначен момент времени, в который определили угол наклона кривой связывания. На фиг. 5В-5D показаны гистограммы для угла наклона кривой связывания антитела 100 в нм/минуту. GP дикого типа и варианты (T577P, K588F и T577P-K588F) испытывали в супернатанте культуры клеток в отношении связывания с Mab 100. Мутации испытывали в следующих каркасных последовательностях: В) GP из штамма Макона, С) GP из штамма Макона с делецией муциноподобного домена, D) GP из штамма Киквит, Е) GP из штамма Киквит с делецией муциноподобного домена, F) GP из штамма Маинга, G) GP из штамма Маинга с делецией муциноподобного домена.

[0032] ФИГ. 6. А, С) Содержание тримеров на основании результатов аналитической SEC, и В, D) угол наклона кривой ассоциации с Mab 100, измеренный с помощью биослойной интерферометрии, для замены K588 на несколько гидрофобных остатков испытывали с применением GP из штамма Маинга (А и В), и для замены K588 на все возможные аминокислоты испытывали с применением каркасной последовательности GP из штамма Маинга с делецией муциноподобного домена (С и D).

[0033] ФИГ. 7. Проведение аналитической SEC на супернатантах культуры

клеток, содержащих GP вируса Марбург с делецией муциноподобного домена. Пик тримера указан пунктирной линией, обозначенной словом "тример". Показаны уровни экспрессии, измеренные с помощью аналитической SEC, для каркасной последовательности GP вируса Марбург с делецией муциноподобного домена (прерывистая линия черного цвета) и вариантов с заменой H588F (сплошная линия светло-серого цвета) и заменой H588I (сплошная линия темно-серого цвета).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0034] Различные публикации, статьи и патенты цитируются или описываются в разделе "Предпосылки изобретения" и на протяжении всего описания; при этом каждый из этих литературных источников включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которое было включено в настоящее описание, предназначено для обеспечения контекста настоящего изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что любые или все из этих материалов являются частью предшествующего уровня техники относительно любых раскрытых или заявленных изобретений.

[0035] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимает специалист средней квалификации в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В иных случаях определенные термины, используемые в данном документе, имеют значения, изложенные в описании. Все патенты, опубликованные заявки на патент и публикации патентов, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены в данном документе. Следует отметить, что используемые в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

[0036] Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в данном документе, во всех случаях следует понимать как модифицированные термином "приблизительно". Таким образом, числовое значение обычно включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Как используется в данном документе, применение числового диапазона однозначно включает все возможные поддиапазоны, все индивидуальные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если в контексте явно не указано иное.

[0037] Аминокислоты упоминаются на протяжении всего настоящего раскрытия. Существует двадцать встречающихся в природе аминокислот, а также множество не встречающихся в природе аминокислот. Каждая известная аминокислота, в том числе как аминокислоты, встречающиеся в природе, так и аминокислоты, не встречающиеся в природе, имеет полное название, сокращенный однобуквенный код и сокращенный трехбуквенный код, все из которых хорошо известны специалистам средней квалификации в данной области техники. Например, для двадцати встречающихся в природе аминокислот применяются следующие трех- и однобуквенные сокращенные

коды: аланин (Ala; A), аргинин (Arg; R), аспарагиновая кислота (Asp; D), аспарагин (Asn; N), цистеин (Cys; C), глицин (Gly; G), глутаминовая кислота (Glu; E), глутамин (Gln; Q), гистидин (His; H), изолейцин (Ile; I), лейцин (Leu; L), лизин (Lys; K), метионин (Met; M), фенилаланин (Phe; F), пролин (Pro; P), серин (Ser; S), треонин (Thr; T), триптофан (Trp; W), тирозин (Tyr; Y) и валин (Val; V). Аминокислоты могут обозначаться с помощью своего полного названия, однобуквенного сокращенного кода или трехбуквенного сокращенного кода.

Если контекст явно не предусматривает иное, нумерация положений в аминокислотной последовательности гликопротеина филловируса, применяемая в данном документе, соответствует нумерации в гликопротеине в Z/Zaire/Yambuku/1976/057935, также называемого изолятом Маинга, как, например, представлено в Sanchez et al. Proc Natl Acad Sci США. 1996 Apr 16;93(8):3602-7, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Нумерация в соответствии с изолятом Z/Zaire/Yambuku/1976/057935 является традиционной в области GP филловируса. GP из штамма Z/Zaire/Yambuku/1976/057935 имеет аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1. Выравнивание представляющей интерес последовательности GP филловируса с данной последовательностью можно применять для поиска соответствующей нумерации аминокислот в представляющей интерес последовательности.

[0038] Выражение "соответствующее положение" в последовательности GP филловируса относится к положению аминокислотного остатка при выравнивании по меньшей мере двух последовательностей GP филловируса. Если не указано иное, нумерация положений аминокислот для этих целей соответствует нумерации в GP изолята Z/Zaire/Yambuku/1976/057935 (SEQ ID NO: 1), как принято в данной области техники.

[0039] Как используется в данном документе, "стабилизирующая мутация" или "стабилизирующая замена" представляет собой мутацию, описанную в данном документе, которая обеспечивает увеличение процентной доли тримера и/или выхода тримера (что может быть измерено, например, с помощью анализов Native-PAGE, AlphaLISA или аналитической SEC, описанных в данном документе) GP филловируса по сравнению с исходной молекулой, если мутация введена посредством замены соответствующей аминокислоты в указанной исходной молекуле. Аминокислоты, полученные в результате таких стабилизирующих мутаций, как правило, редко или совсем не встречаются в гликопротеинах из изолятов филловируса дикого типа.

[0040] Термины "природный" или "дикого типа" используются в данном документе взаимозаменяемо при обозначении штаммов филловируса (или гликопротеинов из них), и они относятся к штаммам филловируса (или гликопротеинам из них), встречающимся в природе, например, таким как у пациентов, инфицированных филловирусом.

[0041] Настоящее изобретение в целом относится к рекомбинантному GP филловируса, содержащему определенные аминокислотные замены в указанных положениях в последовательности GP, которые стабилизируют тримерную форму

гликопротеина. Введение одной или нескольких из указанных аминокислотных замен по настоящему изобретению в последовательность гликопротеина филовируса может приводить в результате к повышению процентной доли образования тримера и/или повышению выхода тримера. Это может, например, быть определено путем применения антител, специфичных к тримеру, эксклюзионной хроматографии или измерения температуры плавления. Аффинность связывания с антителами, которые связываются с правильно свернутым (имеющим стабильную тримерную форму) или, в качестве альтернативы, с неправильно свернутым (имеющим нестабильную форму или форму, отличающуюся от тримерной) гликопротеином, повышение процентной доли тримера и/или выхода тримера считаются показателями стабильного, нативного, правильно свернутого гликопротеина.

[0042] Семейство *Filoviridae* в таксономическом смысле объединяет в себе несколько родственных типов вирусов (филовирусов или представителей семейства *Filoviridae*), которые образуют нитевидные инфекционные вирусные частицы (вирионы), и геном которых закодирован в виде однонитевой РНК с отрицательной полярностью. Двумя широко известными представителями семейства являются вирус Эбола и вирус Марбург. Первый штамм рода *Marburgvirus* был открыт в 1967 году, когда он был транспортирован вместе с импортированными обезьянами в город Марбург в Германии и явился причиной вспышки с летальным исходом. Первый штамм рода *Ebolavirus* был открыт в 1976 года, и был назван в честь реки Эбола в северном бассейне реки Конго в Центральной Африке, где он был впервые обнаружен. Типовые виды включают *Lake Victoria marburgvirus* типа Марбург и *Zaire ebolavirus* типа Эбола. Описано четыре других вида вируса Эбола: *Reston ebolavirus*, *Sudan ebolavirus*, *Tai Forest ebolavirus* и *Bundibugyo ebolavirus*. Вирус Эбола подтипа Заир (ZEBOV) обоснованно считается наиболее смертоносным для популяции Центральной и Западной Африки, при этом существует три основных варианта, вызвавших вспышки заболевания. Вариант Маинга, вызвавший вспышку заболевания в 1976 году, стал причиной 380 случаев заболевания с 218 смертельными исходами (показатель летальности (CFR) 88%), и вариант Киквит в 1995 году стал причиной 315 случаев заболевания с 250 смертельными исходами (CFR 81%). Вспышка заражения вирусом Эбола в Западной Африке в 2013-2016 годах насчитывала 28616 подтвержденных случаев заболевания и 11310 смертей. (http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/208883/ebolasitrep_10Jun2016_eng.pdf;jsessionid=C2C2F22702591E56868CCE902ED5622F?sequence=1)

[0043] В одном общем аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному GP филовируса. При ссылке на белок термин "рекомбинантный" относится к белку, который получен с помощью рекомбинантной методики или с помощью химического синтеза *in vitro*. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения "рекомбинантный" белок имеет искусственную аминокислотную последовательность, в которой он содержит по меньшей мере один элемент последовательности (например, аминокислотную замену, делецию, добавление,

замещение последовательности и т. д.), который не встречается в соответствующей встречающейся в природе последовательности. Предпочтительно "рекомбинантный" белок представляет собой не встречающийся в природе гликопротеин филовируса, который оптимизирован для индуцирования иммунного ответа или обеспечения выработки иммунитета в отношении одного или нескольких встречающихся в природе штаммов филовируса.

[0044] Термины "гликопротеин филовируса", "GP филовируса" и "GP" относятся к гликопротеину или его фрагменту или производному, который в природных условиях экспрессируется на оболочке вириона филовируса и позволяет филовирусу нацеливаться на плазматическую мембрану инфицируемых филовирусом клеток и прикрепляться к ней.

[0045] В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения "белок GP филовируса" может представлять собой эктодомен (аминокислоты 1-647) гликопротеина вируса Эбола Заир дикого типа, или, например, вариантов Маинга, Макона или Киквит. Эктодомен гликопротеина вируса Эбола Заир дикого типа представляет собой гликопротеин, который был усечен с целью удаления трансмембранного участка GP. Эктодомены являются растворимыми и, следовательно, их более легко подвергать манипуляциям и испытывать на предмет стабильности.

[0046] В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения "белок GP филовируса" может также представлять собой эктодомен (аминокислоты 1-647) гликопротеина вируса Эбола Заир дикого типа с делецией муциноподобного домена. Муциноподобный домен образует отдельный домен, который свободно свисает по сторонам каждого из протомеров. Данный домен является высокогликозилированным и существует не много нейтрализующих антител, направленных на него. GP вируса Эбола, в составе которого отсутствует муциноподобный домен, образует тримеры в конформации до слияния, которые легче анализировать и характеризовать, чем GP, содержащие муциноподобный домен. Для получения GP с делецией муциноподобного домена из штамма Маинга из состава GP осуществляли удаление от аминокислотного остатка 320 до аминокислотного остатка 476. Для получения штаммов Макона и Киквит с GP без муциноподобного домена осуществляли удаление от аминокислотного остатка 314 до аминокислотного остатка 472.

[0047] Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения "белок GP филовируса" может представлять собой эктодомен белка GP филовируса с С-концевой меткой, такой как метка His6.

[0048] Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, "гликопротеин филовируса" может представлять собой тример или мономер и предпочтительно представляет собой тример. Тример может представлять собой гомотример (например, тримеры, содержащие три идентичные полипептидные единицы) или гетеротример (например, тримеры, содержащие три полипептидные единицы, не все из которых являются идентичными). Предпочтительно тример представляет собой гомотример.

[0049] "Гликопротеин филовируса" может представлять собой растворимый белок

или мембраносвязанный белок. Мембраносвязанные белки оболочки, как правило, содержат трансмембранный домен, такой как в полном размере гликопротеине филловируса, содержащем трансмембранный домен (ТМ), представленном на ФИГ. 1. Мембраносвязанные белки могут содержать цитоплазматический домен, но наличие цитоплазматического домена не является необходимым для связывания с мембраной. В случае растворимых белков оболочки предусматривается по меньшей мере частичная или полная делеция трансмембранного домена. Например, С-концевой участок полном размерного гликопротеина филловируса может быть усечен для удаления трансмембранного домена, таким образом обеспечивая получение растворимого белка, представленного на ФИГ. 1. Однако гликопротеин филловируса все еще может являться растворимым, имея более короткие усечения и альтернативные положения усечений. Мембраносвязанный гликопротеин согласно настоящему изобретению может содержать полный С-концевой домен или его часть по сравнению с нативным гликопротеином.

[0050] Сигнальный пептид, как правило, присутствует на N-конце GP филловируса во время экспрессии, но отщепляется пептидазой сигнального пептида и, таким образом, не присутствует в зрелом белке. Сигнальный пептид может быть заменен другими сигнальными последовательностями, и некоторые неограничивающие примеры сигнальных пептидов представлены в данном документе под SEQ ID NO: 44 (сигнальный пептид GP вируса Эбола) и 45 (сигнальный пептид GP вируса Марбург).

[0051] Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения гликопротеин филловируса может быть получен из последовательности гликопротеина филловируса из любого штамма вируса Эбола или вируса Марбург, таких как, например, Маинга, Макона, Киквит, Судан Гулу, Марбург и т. д. или их комбинации. Последовательность гликопротеина филловируса может представлять собой встречающуюся в природе последовательность, консенсусную последовательность, синтетическую последовательность или любое их производное или фрагмент. Используемое в данном документе выражение "консенсусная последовательность" означает искусственную последовательность аминокислот, полученную на основе результатов выравнивания аминокислотных последовательностей гомологичных белков, например, определенную с помощью выравнивания аминокислотных последовательностей гомологичных белков. "Синтетическая последовательность" представляет собой не встречающийся в природе гликопротеин филловируса, который является оптимизированным для индуцирования иммунного ответа или обеспечения выработки иммунитета в отношении более чем одного встречающегося в природе штамма филловируса.

[0052] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения GP филловируса представляет собой встречающийся в природе гликопротеин, консенсусный гликопротеин или синтетический гликопротеин, который содержит незаряженный аминокислотный остаток в положении 588, при этом нумерация положений соответствует нумерации GP в изоляте Z/Zaire/Yambuku/1976/057935 (SEQ ID NO:1), и при этом незаряженный аминокислотный остаток не представляет собой цистеин. В частности,

предпочтительными являются гликопротеины, где незаряженный аминокислотный остаток представляет собой гидрофобный аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из F, I, A, L, M, V, W и Y. Еще более предпочтительными являются гликопротеины, где гидрофобный аминокислотный остаток выбран из группы, состоящей из F, I, V и W. Наиболее предпочтительными являются гликопротеины, где гидрофобный аминокислотный остаток представляет собой F.

[0053] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения гликопротеин филовируса, будь то встречающаяся в природе последовательность, консенсусная последовательность, синтетическая последовательность и т. д., дополнительно содержит аминокислотный остаток Р в положении 577 и/или 579, при этом нумерация положений соответствует нумерации GP в изоляте Z/Zaire/Yambuku/1976/057935.

[0054] Аминокислотная последовательность гликопротеина филовируса, в которую вводят одну или несколько замен на необходимую аминокислоту (или указанную аминокислоту) в одном или нескольких указанных положениях, обозначается как "каркасная последовательность GP филовируса" или "исходная последовательность GP филовируса". Например, если аминокислотный остаток в положении 588 в последовательности "GP-647 Маинга без муциноподобного домена" (т. е. эктодомена GP, характеризующегося делецией аминокислот 320-476) под SEQ ID NO: 6 подвергнут мутации, обеспечивающей замену на F, то последовательность "GP-647 Маинга без муциноподобного домена" считается "каркасной" или "исходной" последовательностью. Любой гликопротеин филовируса может применяться в качестве "каркасной" или "исходной" последовательности, в которую можно вводить новую стабилизирующую мутацию согласно варианту осуществления настоящего изобретения, либо отдельно, либо в комбинации с другими мутациями, такими как мутации в положениях 577 или 579.

[0055] Неограничивающие примеры GP филовируса, который можно применять в качестве каркасной последовательности, включают GP филовируса из природного изолята филовируса, синтетический GP филовируса или консенсусный GP филовируса, и в некоторых неограничивающих примерах включают гликопротеины, содержащие SEQ ID NO: 2-42.

[0056] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения каркасная последовательность гликопротеина филовируса выбрана из группы, состоящей из

1) гликопротеина из штамма Маинга вируса Эбола Заир, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, или гликопротеина из штамма Маинга вируса Эбола Заир с делецией от аминокислотного остатка 320 до аминокислотного остатка 476, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; и

2) гликопротеина GP из штамма Макона вируса Эбола Заир, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, или гликопротеина GP из

штамма Макона вируса Эбола Заир с делецией от аминокислотного остатка 314 до аминокислотного остатка 472, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14; и

3) гликопротеина из штамма Киквит вируса Эбола Заир, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, или гликопротеина из штамма Киквит вируса Эбола Заир с делецией от аминокислотного остатка 314 до аминокислотного остатка 472, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23; и

4) гликопротеина вируса Марбург с делецией от аминокислотного остатка 255 до аминокислотного остатка 423, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27,

при этом нумерация положений соответствует нумерации GP в изоляте Z/Zaire/Yambuku/1976/057935.

[0057] Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения рекомбинантный GP филовируса характеризуется по меньшей мере одним параметром из (a) увеличенной процентной доли образования тримера и (b) увеличенного выхода тримера по сравнению с GP филовируса, не имеющим указанных аминокислотных остатков в положении 588.

[0058] Используемое в данном документе выражение "увеличенная процентная доля образования тримера" означает, что образуется большая процентная доля тримера, если каркасная последовательность гликопротеина филовируса содержит одну или несколько из аминокислотных замен по настоящему изобретению, по сравнению с процентной долей тримера, которая образуется, если каркасная последовательность последовательности GP филовируса не содержит таких аминокислотных замен. Используемое в данном документе выражение "увеличенный выход тримера" означает, что получают большее общее количество тримерной формы белка оболочки, если каркасная последовательность гликопротеина филовируса содержит одну или несколько из аминокислотных замен по настоящему изобретению, по сравнению с общим количеством тримерной формы белка оболочки, получаемым, которое получают, если каркасная последовательность последовательности белка GP филовируса не содержит таких аминокислотных замен.

[0059] Уровень образования тримера можно измерять с помощью анализа связывания антителами с применением антител, которые специфически связываются с тримерной формой GP филовируса. Примеры антител, специфичных к тримеру, которые можно применять для выявления тримерной формы, включают без ограничения моноклональное антитело (mAb): Mab 100. Любой анализ связывания антителами, известный из уровня техники, в свете настоящего раскрытия, можно применять для измерения процентной доли образования тримера рекомбинантного GP филовируса по настоящему изобретению, такой как ELISA, биослойная интерферометрия и т. д.

[0060] В конкретном варианте осуществления уровень образования тримера

измеряют с помощью биослойной интерферометрии (BLI)

"Антитело 100 иммобилизовали на сенсорах с антителами к hIgG (АНС) (FortéBio, № по кат. 18-5060) при концентрации 10 мкг/мл в 1х буфере для кинетического анализа (FortéBio, № по кат. 18-1092) в 96-луночных черных полипропиленовых микропланшетах с половинным объемом лунки и плоским дном (FortéBio, № по кат. 3694). Эксперимент проводили с помощью прибора Octet HTX (Pall-FortéBio) при 30°C и скорости встряхивания, составлявшей 1000 об./мин. Активацию проводили в течение 60 секунд, иммобилизацию антител - в течение 600 секунд, затем промывали в течение 150 секунд и после этого обеспечивали связывание с Env в течение 600 секунд с последующей диссоциацией в течение 60 секунд, встряхивая всю систему при 1000 об./мин. Анализ данных проводили с применением программного обеспечения FortéBio Data Analysis версии 8.1 (FortéBio). Угол наклона кривой связывания определяли в момент времени 10 секунд в нм/минуту".

[0061] AlphaLISA представляет собой анализ с применением эффекта сближения на основе гранул, в котором синглетные молекулы кислорода, генерируемые за счет высокоэнергетического излучения донорных гранул, переносятся на акцепторные гранулы, которые расположены в пределах расстояния, составляющего приблизительно 200 нм, относительно донорных гранул. Перенос синглетных молекул кислорода на акцепторные гранулы инициирует каскад из серии химических реакций, приводящих в результате к генерированию хемилюминесцентного сигнала, который затем можно выявлять (Eglen et al. *Curr. Chem. Genomics*, 2008, 25(1): 2-10). Например, рекомбинантные гликопротеины филловируса, меченные с помощью метки Flag-His могут быть инкубированы одновременно с 2 разными видами гранул, конъюгированными с никелем или антителом, которое может связываться с GP. При проведении анализа для специфического определения тримера использовали донорные гранулы, конъюгированные с Mab 100, специфичным к тримеру, и акцепторные гранулы, конъюгированные с никелем, которые связываются с меткой His6 или антителом к His. Для количественного определения GP использовали донорные гранулы, конъюгированные с антителом к Flag, и акцепторные гранулы, конъюгированные с никелем или антителом к His. Количество образовавшегося тримера можно определять путем измерения хемилюминесцентного сигнала, генерируемого парой из донорных гранул, конъюгированных с антителом, которое связывается с mAb к тримеру, и акцепторных гранул, конъюгированных с антителом к метке His. Общее количество экспрессированного гликопротеина филловируса можно определять путем измерения хемилюминесцентного сигнала, генерируемого парой из донорных гранул, конъюгированных с никелем, и акцепторных гранул, конъюгированных с антителом к метке Flag. Например, количество тримера и общего экспрессированного белка оболочки можно измерять с помощью анализа AlphaLISA, как подробно описано в примере 3. Процентную долю образования тримера можно рассчитать путем деления количества образовавшегося тримера на общее количество экспрессированного белка оболочки.

[0062] Количество образовавшегося тримера и общее количество экспрессированного белка оболочки также можно определять с применением хроматографических методик, с помощью которых которые можно отделять тримерную форму от остальных форм гликопротеина филловируса, например мономерной формы. Примеры таких методик, которые можно применять, включают без ограничения аналитическую эксклюзионную хроматографию (SEC). Согласно определенным вариантам осуществления процентную долю образования тримера определяют с помощью аналитической SEC. Согласно определенным вариантам осуществления выход тримера определяют с помощью аналитической SEC.

Нуклеиновая кислота, векторы и клетки

[0063] В другом общем аспекте в настоящем изобретении предусмотрена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный GP филловируса согласно настоящему изобретению, и вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты. Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут быть представлены в форме РНК или в форме ДНК, полученных путем клонирования или изготовленных синтетическим путем. ДНК может быть двухнитевой или однонитевой. ДНК, например, может предусматривать cDNA, геномную ДНК или их комбинации. Молекулы нуклеиновой кислоты и векторы можно применять для получения рекомбинантного белка, экспрессии белка в клетке-хозяине или получения вирусных частиц.

[0064] Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный гликопротеин филловируса, функционально связана с промотором, что означает, что нуклеиновая кислота находится под контролем промотора. Промотор может представлять собой гомологичный промотор (т. е. происходящий из того же источника генетического материала, что и вектор) или гетерологичный промотор (т. е. происходящий из другого вектора или источника генетического материала). Примеры подходящих промоторов включают немедленно-ранний промотор цитомегаловируса человека (hCMV IE, или сокращенно "CMV") и промотор вируса саркомы Рауса (RSV). Промотор предпочтительно расположен выше нуклеиновой кислоты, находящейся в кассете экспрессии.

[0065] Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения вектор может представлять собой вектор экспрессии. Векторы экспрессии включают без ограничения векторы для экспрессии рекомбинантного белка и векторы для доставки нуклеиновой кислоты в организм субъекта для экспрессии в ткани субъекта, как, например, вирусный вектор. Примеры вирусных векторов, подходящих для применения в настоящем изобретении, включают без ограничения аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса, поксвирусные векторы, векторы на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), энтеровирусные векторы, векторы на основе вируса венесуэльского энцефалита лошадей, векторы на основе вируса леса Семлики, векторы на основе вируса табачной мозаики, лентивирусные векторы и т. д. Вектор также может представлять собой вектор, отличный от вирусного. Примеры

векторов, отличных от вирусных, включают без ограничения плазмиды, искусственные бактериальные хромосомы, искусственные хромосомы дрожжей, бактериофаги и т. д.

[0066] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения вектор представляет собой аденовирусный вектор, например рекомбинантный аденовирусный вектор. Например, рекомбинантный аденовирусный вектор может происходить из аденовируса человека (HAdV или AdHu) или аденовируса обезьян, такого как аденовирус шимпанзе или гориллы (ChAd, AdCh или SAdV), или аденовирус макака-резуса (rhAd). Предпочтительно аденовирусный вектор представляет собой вектор на основе рекомбинантного аденовируса человека, например рекомбинантного аденовируса человека серотипа 26 или любого из рекомбинантных аденовирусов человека серотипов 5, 4, 35, 7, 48 и т. д. В других вариантах осуществления аденовирусный вектор представляет собой вектор rhAd, например rhAd51, rhAd52 или rhAd53.

[0067] Получение рекомбинантных аденовирусных векторов хорошо известно из уровня техники. Например, получение векторов на основе рекомбинантного аденовируса 26 описано, например, в WO 2007/104792 и в Abbink et al., (2007) *Virol.* 81(9): 4654-63. Иллюстративные геномные последовательности аденовируса 26 находятся в GenBank под номером доступа EF 153474 и под SEQ ID NO: 1 в WO 2007/104792. Иллюстративные геномные последовательности rhAd51, rhAd52 и rhAd53 представлены в US 2015/0291935.

[0068] Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения любой из рекомбинантных GP филовируса, описанных в данном документе, может экспрессироваться и/или кодироваться с помощью любого из векторов, описанных в данном документе. С учетом вырожденности генетического кода специалисту в данной области техники хорошо известно, что можно сконструировать несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, которые кодируют один и тот же белок, согласно способам, полностью соответствующим установленной практике в данной области техники. Нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный GP филовируса по настоящему изобретению, можно необязательно подвергнуть оптимизации кодонов для обеспечения надлежащей экспрессии в клетке-хозяине (например, клетках бактерий или млекопитающих). Оптимизация кодонов представляет собой технологию, широко применяемую в данной области техники.

[0069] В настоящем изобретении также предусмотрены клетки, предпочтительно выделенные клетки, содержащие любые из молекул нуклеиновой кислоты и векторов, описанных в данном документе. Например, клетки можно применять для получения рекомбинантного белка или для получения вирусных частиц.

[0070] Таким образом, варианты осуществления настоящего изобретения также относятся к способу получения рекомбинантного GP филовируса. Способ включает трансфекцию клетки-хозяина вектором экспрессии, содержащим нуклеиновую кислоту, которая кодирует рекомбинантный GP филовируса согласно варианту осуществления настоящего изобретения, функционально связанную с промотором, выращивание трансфицированной клетки в условиях, подходящих для экспрессии рекомбинантного GP

филовируса, и необязательно очистку или выделение рекомбинантного GP филовируса, экспрессированного в клетке. Рекомбинантный GP филовируса может быть выделен или собран из клетки с помощью любого способа, известного из уровня техники, в том числе аффинной хроматографии, эксклюзионной хроматографии и т. д. Методики, применяемые для экспрессии рекомбинантного белка, будут хорошо известны специалисту средней квалификации в данной области техники в свете настоящего изобретения. Экспрессированный рекомбинантный GP филовируса также можно исследовать без проведения очистки или выделения экспрессированного белка, например путем анализа супернатанта клеток, трансфицированных с помощью вектора экспрессии, кодирующего рекомбинантный GP филовируса и выращенных в условиях, подходящих для экспрессии GP филовируса.

[0071] В предпочтительном варианте осуществления экспрессированный рекомбинантный GP филовируса очищают в условиях, которые обеспечивают сборку белка, благодаря чему образуется стабилизированный тримерный комплекс. Например, клетки млекопитающих, трансфицированные с помощью вектора экспрессии, кодирующего рекомбинантный GP филовируса, функционально связанный с промотором (например, с промотором CMV), можно культивировать при 33-39°C, например при 37°C, и 2-12% CO₂, например 8% CO₂. Экспрессию также можно осуществлять в альтернативных системах экспрессии, таких как клетки насекомых или клетки дрожжей, все они традиционно применяются в данной области техники. Затем экспрессированный GP филовируса может быть выделен из культуры клеток с помощью, например, аффинной хроматографии с применением лектина, с помощью которой связывают гликопротеины. GP филовируса, связавшийся с колонкой, можно элюировать с помощью маннопиранозида. При необходимости GP филовируса, элюированный из колонки, можно подвергать дополнительным стадиям очистки, таким как, например, эксклюзионная хроматография, для удаления любых остаточных примесей, например клеточных примесей. Для выделения экспрессированного GP филовируса также можно применять альтернативные способы очистки, при этом неограничивающие примеры включают аффинную хроматографию с применением антител, негативный отбор с помощью антител, отличных от bNAb, очистку с помощью антитела к метке или другие способы хроматографии, такие как ионообменная хроматография и т. д., а также другие способы, известные из уровня техники.

[0072] Молекулы нуклеиновой кислоты и векторы экспрессии, кодирующие рекомбинантные GP филовируса по настоящему изобретению, можно получать с помощью любого способа, известного из уровня техники, в свете настоящего изобретения. Например, нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный белок GP филовируса можно получать путем введения по меньшей мере одной из аминокислотных замен в указанные положения в каркасную последовательность белка GP филовируса с применением технологии генетической инженерии и методик молекулярной биологии, например сайт-направленного мутагенеза, полимеразной цепной реакции (ПЦР) и т. д.,

которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Затем молекулу нуклеиновой кислоты можно вводить или "клонировать" в вектор экспрессии также с применением стандартных методик молекулярной биологии. Затем рекомбинантный гликопротеин филовируса может быть экспрессирован с вектора экспрессии в клетке-хозяине, и экспрессированный белок может быть очищен из культуры клеток с помощью любого способа, известного из уровня техники, в свете настоящего изобретения.

Тримерный комплекс

[0073] В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к тримерному комплексу, содержащему нековалентно связанный олигомер из трех рекомбинантных GP филовируса согласно настоящему изобретению. Тримерный комплекс может содержать любой из рекомбинантных GP филовируса, описанных в данном документе. Предпочтительно тримерный комплекс содержит три идентичных мономера, представляющих собой рекомбинантные GP филовируса согласно настоящему изобретению. Тримерный комплекс можно отделять от других форм гликопротеина филовируса, таких как мономерная форма, или тримерный комплекс может присутствовать вместе с другими формами гликопротеина филовируса, такими как мономерная форма.

Композиции и способы

[0074] В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей рекомбинантный GP филовируса, тримерный комплекс, выделенную нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяина и фармацевтически приемлемый носитель. Композиция может содержать любой из рекомбинантных GP филовируса, тримерных комплексов, выделенных молекул нуклеиновой кислоты, векторов или клеток-хозяев, описанных в данном документе.

[0075] Носитель может включать одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, таких как связывающие вещества, разрыхлители, вещества, способствующие набуханию, суспендирующие средства, эмульгирующие средства, смачивающие средства, смазывающие вещества, ароматизаторы, подсластители, консерванты, красители, солюбилизаторы и покрытия. Конкретная природа носителя или другого материала может зависеть от пути введения, например внутримышечного, внутрикожного, подкожного, перорального, внутривенного, чрескожного, внутрислизистого (например, в кишечнике), интраназального или внутрибрюшинного путей. В случае жидких инъекционных препаратов, например суспензий и растворов, подходящие носители и добавки включают воду, гликоли, масла, спирты, консерванты, красящие средства и т. п. В случае твердых препаратов для перорального введения, например порошков, капсул, капсуловидных таблеток, желатиновых капсул и таблеток, подходящие носители и добавки включают разновидности крахмала, сахара, разбавители, гранулирующие средства, смазывающие вещества, связывающие вещества, разрыхлители и т. п. В случае назальных спреев/смесей для ингаляции водный раствор/суспензия может содержать воду, гликоли, масла, смягчающие вещества, стабилизаторы, смачивающие

средства, консерванты, душистые вещества, вкусоароматические добавки и т. п. в качестве подходящих носителей и добавок.

[0076] Для облегчения введения и увеличения эффективности композиции по настоящему изобретению можно составлять в любой форме, подходящей для введения субъекту, в том числе без ограничения в форме для перорального (энтерального) введения и парентеральных инъекций. Парентеральные инъекции включают внутривенную инъекцию или инфузию, подкожную инъекцию, внутрикожную инъекцию и внутримышечную инъекцию. Композиции по настоящему изобретению также можно составлять для других путей введения, в том числе для чресслизистого, глазного, ректального введения, введения посредством имплантата длительного действия, сублингвального введения, введения "под язык", введения через слизистую оболочку полости рта в обход портального кровообращения, ингаляционного или интраназального введения.

[0077] Варианты осуществления настоящего изобретения также относятся к способам получения композиции. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения способ получения композиции включает смешивание рекомбинантного GP филовируса, тримерного комплекса, выделенной нуклеиновой кислоты, вектора или клетки-хозяина по настоящему изобретению с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. Специалисту средней квалификации в данной области техники будут хорошо известны традиционные методики, применяемые для получения таких композиций.

[0078] Антигены филовируса (например, белки или их фрагменты, происходящие из продуктов генов гликопротеина филовируса) и векторы, такие как вирусные векторы, обеспечивающие экспрессию антигенов филовируса, ранее применяли в иммуногенных композициях и вакцинах для вакцинации субъекта против инфекции, вызываемой филовирусом, или для выработки у субъекта иммунного ответа на инфекцию, вызываемую филовирусом. Используемый в данном документе термин "субъект" означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека, которому будут вводить или вводили иммуногенную композицию по вариантам осуществления настоящего изобретения. Используемый в данном документе термин "млекопитающее" охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают без ограничения мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т. д., предпочтительно человека. Рекомбинантные GP филовируса по настоящему изобретению также можно применять в качестве антигенов для индуцирования иммунного ответа на филовирус у субъекта, нуждающегося в этом. Данный иммунный ответ может представлять собой иммунный ответ на один или нескольких вариантов филовируса, таких как штаммы Маинга, Киквит и Макона вируса Эбола Заир или вирус Марбург. Композиции могут содержать вектор, с которого экспрессируется рекомбинантный GP филовируса, или композиция может содержать выделенный рекомбинантный GP филовируса согласно варианту осуществления настоящего

изобретения.

[0079] Например, композиции, содержащие рекомбинантный белок филовируса или его тримерный комплекс, можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом, для индуцирования у субъекта иммунного ответа на инфекцию, вызываемую филовирусом. Композицию, содержащую вектор, такой как аденовирусный вектор, кодирующий рекомбинантный GP филовируса по настоящему изобретению, где рекомбинантный GP филовируса экспрессируется с помощью вектора, также можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом, для индуцирования у субъекта иммунного ответа на инфекцию, вызываемую филовирусом. Способы, описанные в данном документе, также включают введение композиции по настоящему изобретению в комбинации с одним или несколькими дополнительными GP филовируса, которые предпочтительно экспрессируются из одного или нескольких векторов, таких как аденовирусные векторы или векторы на основе MVA, в том числе способы примирования и усиления иммунного ответа.

[0080] В определенных вариантах осуществления GP филовируса может быть представлен на частице, такой как липосома, вирусоподобная частица (VLP), наночастица, виросома или экзосома, необязательно в комбинации с эндогенными и/или экзогенными адьювантами. По сравнению с отдельно взятым растворимым или мономерным гликопротеином такие частицы обычно проявляют повышенную эффективность в отношении презентации антигена *in vivo*.

Примеры VLP, на которых представлен GP филовируса, могут быть получены, например, с помощью совместной экспрессии GP филовируса с самособирающимися вирусными белками. VLP сходны с вирусами, но не обладают способностью к инфицированию, поскольку они не содержат вирусного генетического материала. Экспрессия вирусных структурных белков, таких как белки оболочки или капсида, может приводить в результате к самосборке VLP. VLP хорошо известны специалисту в данной области техники, и их применение в вакцинах описано, например, в (Kushnir et al., *Vaccine*. 2012 Dec 17;31(1):58-83).

В определенных предпочтительных вариантах осуществления частица представляет собой липосому. Липосома представляет собой сферическую везикулу, имеющую по меньшей мере один липидный бислой. Например, тримерные белки из GP филовируса можно нековалентно присоединять к таким липосомам за счет электростатических взаимодействий, например путем добавления His-метки на C-конец тримера из GP филовируса и введения бивалентного хелатообразующего атома, такого как Ni^{2+} или Co^{2+} , в головную группу дериватизированных липидов в липосоме. В определенных неограничивающих и иллюстративных вариантах осуществления липосома содержит 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), холестерин и никелевую или кобальтовую соль 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-[(N-(5-амино-1-карбокспентил)иминодиуксусной кислоты)сукцинила] (DGS-NTA(Ni^{2+}) или DGS-NTA(Co^{2+})) в молярном соотношении 60:36:4. В предпочтительных вариантах

осуществления тримерные белки из GP филловируса ковалентно присоединены к поверхности липосомы, например, посредством малеимидной функциональной группы, интегрированной в поверхность липосомы. В соответствующих определенных неограничивающих иллюстративных вариантах осуществления липосома содержит DSPC, холестерин и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[4-(*p*-малеимидометил)циклогексанкарбоксамид]липид в молярном соотношении 54:30:16. GP филловируса можно присоединять к ней, например, посредством добавленного С-концевого цистеина в GP филловируса. Варианты с ковалентным присоединением являются более стабильными, вызывают образование высоких титров специфичных в отношении антигена IgG, и эпитопы на менее релевантной в антигенном отношении "нижней части" тримера E_{1v} являются замаскированными. Способы получения тримеров из GP филловируса, присоединенных к липосомам, а также их характеристика являются известными и были описаны, например, в (Bale et al, *J Virol*. 2017 Jul 27;91(16). pii: e00443-17), включенной в данный документ посредством ссылки. В настоящем изобретении также предусмотрен GP филловируса по настоящему изобретению, слитый с липосомой и/или представленный на липосоме.

В определенных вариантах осуществления GP филловируса по настоящему изобретению слит с самособирающимися частицами или представлен на наночастицах. Антигенные наночастицы представляют собой сборки из полипептидов, которые презентируют множество копий антигенов, например GP филловируса по настоящему изобретению, что приводит в результате к образованию множества сайтов связывания (авидности) и может обеспечивать улучшенную стабильность и иммуногенность антигена. Получение и применение самособирающихся белковых наночастиц для применения в вакцинах хорошо известно специалисту в данной области техники, см., например (Zhao L, et al (2014) *Vaccine* 32: 327-337), (López-Sagaseta et al, *Comput Struct Biotechnol J*. 2015 Nov 26;14:58-68). В качестве неограничивающих примеров самособирающиеся наночастицы могут быть основаны на ферритине, бактериоферритине или DPS. Наночастицы на основе DPS, на поверхности которых представлены белки, описаны, например, в WO2011/082087. Другие самособирающиеся белковые наночастицы, а также их получение описаны, например, в WO 2014/124301 и US 2016/0122392, включенных в данный документ посредством ссылки. В настоящем изобретении также предусмотрен GP филловируса по настоящему изобретению, слитый с самособирающейся наночастицей и/или представленный на ней. В настоящем изобретении также предусмотрены композиции, содержащие VLP, липосомы или самособирающиеся наночастицы согласно настоящему изобретению.

[0081] В определенных вариантах осуществления адъювант включают в композицию по настоящему изобретению или совместно вводят с композицией по настоящему изобретению. Применение адъюванта является необязательным, и он может дополнительно усиливать виды иммунного ответа, когда композицию применяют в целях вакцинации. Адъюванты, подходящие для совместного введения или включения в

композиции согласно настоящему изобретению, предпочтительно должны быть такими, которые потенциально безопасны, хорошо переносятся и эффективны при применении у человека. Такие адъюванты хорошо известны специалисту в данной области техники, и неограничивающие примеры включают: QS-21, Detox-PC, MPL-SE, MoGM-CSF, TiterMax-G, CRL-1005, GERBU, TERamide, PSC97B, Adjuver, PG-026, GSK-I, GcMAF, В-алетин, MPC-026, Adjuvax, CpG ODN, бетафектин, соли алюминия, такие как фосфат алюминия (например, AdjuPhos) или гидроксид алюминия, и MF59.

[0082] Другие аспекты настоящего изобретения относятся к рекомбинантным гликопротеинам филловируса, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 27. В определенных вариантах осуществления такие GP филловируса можно применять в качестве каркасных последовательностей белков, в которых можно осуществлять мутации, описанные выше, для получения молекулы по настоящему изобретению. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие данные последовательности, векторы, содержащие данные последовательности, функционально связанные с промотором, и композиции, содержащие белок, выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, также предусмотрены в настоящем изобретении.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0083] Вариант осуществления 1 представляет собой рекомбинантный гликопротеин филловируса, содержащий незаряженный аминокислотный остаток в положении 588, где нумерация положений соответствует нумерации GP в изоляте Z/Zaire/Yambuku/1976/057935, и при этом незаряженный аминокислотный остаток не представляет собой цистеин.

[0084] Вариант осуществления 2 представляет собой рекомбинантный гликопротеин филловируса согласно варианту осуществления 1, где незаряженный аминокислотный остаток представляет собой гидрофобный аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из F, I, A, L, M, V, W и Y.

[0085] Вариант осуществления 3 представляет собой рекомбинантный гликопротеин филловируса согласно варианту осуществления 2, где гидрофобный аминокислотный остаток выбран из группы, состоящей из F, I, L, M, V и Y.

[0086] Вариант осуществления 4 представляет собой рекомбинантный гликопротеин филловируса согласно пункту 3, где гидрофобный аминокислотный остаток представляет собой F.

[0087] Вариант осуществления 5 представляет собой рекомбинантный гликопротеин филловируса согласно любому из вариантов осуществления 1-4, дополнительно содержащий аминокислотный остаток P в положении 577 и/или 579, при этом нумерация положений соответствует нумерации GP в изоляте Z/Zaire/Yambuku/1976/057935.

[0088] Вариант осуществления 6 представляет собой рекомбинантный

гликопротеин филовируса согласно любому из вариантов осуществления 1-5, где филовирус относится к штамму, выбранному из группы, состоящей из штамма Маинга, Макона, Киквит, Судан Гулу и вируса Марбург.

[0089] Вариант осуществления 7 представляет собой рекомбинантный гликопротеин филовируса согласно любому из вариантов осуществления 1-6, где гликопротеин филовируса выбран из группы, состоящей из

1) гликопротеина из штамма Маинга вируса Эбола Заир, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, или гликопротеина из штамма Маинга вируса Эбола Заир с делецией от аминокислотного остатка 320 до аминокислотного остатка 476, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; и

2) гликопротеина GP из штамма Макона вируса Эбола Заир, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, или гликопротеина GP из штамма Макона вируса Эбола Заир с делецией от аминокислотного остатка 314 до аминокислотного остатка 472, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14; и

3) гликопротеина из штамма Киквит вируса Эбола Заир, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, или гликопротеина из штамма Киквит вируса Эбола Заир с делецией от аминокислотного остатка 314 до аминокислотного остатка 472, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23; и

4) гликопротеина вируса Марбург с делецией от аминокислотного остатка 255 до аминокислотного остатка 423, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27;

при этом нумерация положений соответствует нумерации GP в изоляте Z/Zaire/Yambuku/1976/057935.

[0090] Вариант осуществления 8 представляет собой рекомбинантный гликопротеин филовируса согласно любому из вариантов осуществления 1-7, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 2-42.

[0091] Вариант осуществления 9 представляет собой тримерный комплекс, содержащий нековалентно связанный олигомер, состоящий из трех рекомбинантных гликопротеинов филовируса согласно любому из вариантов осуществления 1-7.

[0092] Вариант осуществления 10 представляет собой частицу, предпочтительно наночастицу, на поверхности которой представлен рекомбинантный гликопротеин филовируса по любому из вариантов осуществления 1-7 или тримерный комплекс по варианту осуществления 8.

[0093] Вариант осуществления 11 представляет собой выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный гликопротеин филовируса согласно любому из вариантов осуществления 1-7.

[0094] Вариант осуществления 12 представляет собой вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты согласно варианту осуществления 11, функционально связанную с промотором.

[0095] Вариант осуществления 13 представляет собой вектор согласно варианту осуществления 12, где вектор представляет собой аденовирусный вектор.

[0096] Вариант осуществления 14 представляет собой клетку-хозяина, содержащую выделенную молекулу нуклеиновой кислоты согласно варианту осуществления 11 или вектор согласно вариантам осуществления 12 или 13.

[0097] Вариант осуществления 15 представляет собой способ получения рекомбинантного гликопротеина филовируса, включающий выращивание клетки-хозяина согласно варианту осуществления 14 в условиях, подходящих для получения рекомбинантного гликопротеина филовируса.

[0098] Вариант осуществления 16 представляет собой композицию, содержащую рекомбинантный гликопротеин филовируса согласно любому из вариантов осуществления 1-8, тримерный комплекс по пункту 9, частицу по пункту 10, выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по пункту 11 или вектор по пункту 12 или пункту 13 и фармацевтически приемлемый носитель.

[0099] Вариант осуществления 17 представляет собой способ увеличения уровня образования тримера гликопротеина филовируса, где способ включает замену аминокислотного остатка в положении 588 последовательности гликопротеина на незаряженный аминокислотный остаток, при этом нумерация положений соответствует нумерации GP в изоляте Z/Zaire/Yambuku/1976/057935, и при этом незаряженный аминокислотный остаток не представляет собой цистеин.

[0100] Вариант осуществления 18 представляет собой способ согласно варианту осуществления 17, при этом способ дополнительно включает замену аминокислотного остатка в положении 577 и/или 579 последовательности гликопротеина на остаток R, при этом нумерация положений соответствует нумерации GP в изоляте Z/Zaire/Yambuku/1976/057935.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Обеспечение экспрессии и очистка рекомбинантных гликопротеинов (GP) вируса Эбола и вируса Марбург

[0101] Эктодомены (т. е. аминокислотные остатки 1-647) рекомбинантных GP вируса Эбола и вируса Марбург получали в результате экспрессии и очищали в виде растворимых белков с муциноподобным доменом или без него. Затем одиночные мутации (аминокислотные замены) и их комбинации (например, двойные и тройные мутации) вводили в следующие различные каркасные последовательности: последовательность GP из штамма Маинга (SEQ ID NO: 2), последовательность GP из штамма Киквит (SEQ ID NO: 19), последовательность GP из штамма EBOV14, также известного как штамм Макона, которая является идентичной консенсусной последовательности штаммов, вызвавших вспышку в 2014 (SEQ ID NO: 10), последовательность GP из MARV (вируса

Марбург) (SEQ ID NO: 41), последовательность GP без муцина из штамма Маинга (SEQ ID NO: 6), последовательность GP без муцина из штамма Киквит (SEQ ID NO: 23), последовательность GP без муцина из штамма EBOV14 (SEQ ID NO: 14) и последовательность GP без муцина из MARV (SEQ ID NO: 27).

Получение и обеспечение экспрессии конструкций и вариантов гликопротеина вируса Эбола и вируса Марбург

[0102] ДНК, кодирующие гликопротеины (GP), представленные под SEQ ID NO: 2-42, синтезировали и оптимизировали по кодонам для экспрессии в клетках человека в GenScript (Пискатауэй, Нью-Джерси 08854). Затем подвергнутые оптимизации по кодомам последовательности клонировали в вектор pcDNA2004 с получением конструкций GP, которые применяли в качестве каркасных последовательностей для введения дополнительных мутаций. Обеспечивали экспрессию генов в клетках Expi293F (Thermo Fischer) в соответствии с описанием, предоставленным изготовителем. Мониторинг уровней глюкозы осуществляли с помощью ViCell MetaFlex (Beckmann). Уровень глюкозы был истощен ко дню 4 после проведения трансфекции и, следовательно, добавляли глюкозу в концентрации 15 мМ. Продукты трансфекции собирали в день 6 после проведения трансфекции с помощью центрифугирования и стерилизующей фильтрации.

Очистка белка GP вируса Эбола и вируса Марбург

[0103] Интерферирующие белки клеток-хозяев (HCP) удаляли путем внесения супернатанта на смолу СНТ типа 1 (Biorad) объемом 13 мл в колонку ХК16/20 (ГЕНС) с применением скорости потока, составлявшей 300 см/ч., и подвижным буфером NaPO₄ в концентрации 5 мМ при pH 6,8. Связанные белки элюировали с помощью ступенчатого элюирования с применением 500 мМ NaPO₄ при pH 7,4. Затем фильтрат, лишенный HCP, вносили в колонку для аффинной хроматографии HisTrap HP объемом 5 мл для селективного разделения белков, меченных His, с применением скорости потока, составляющей 300 см/ч., и подвижного буфера Tris в концентрации 20 мМ, NaCl в концентрации 500 мМ при pH 7,4. Связанные белки элюировали с помощью ступенчатого градиента, состоящего из 15, 30 и 100% буфера для элюирования (20 мМ Tris, 500 мМ NaCl, 300 мМ имидазол при pH 7,4), используя колонку в режиме восходящего потока при скорости потока, составляющей 600 см/ч. Фракции тримеров элюировались при внесении одновременно с агрегатами имидазола в концентрации 100 мМ. Данную фракцию подвергали концентрированию с помощью концентраторов 50K Amicon Ultra (Millipore) и вносили в колонку для эксклюзионной хроматографии (ГЕНС) Superdex 16/600 с применением скорости потока, составляющей 60 см/ч. Затем фракцию тримера отделяли от агрегатов и мономеров. Фракции, содержащие пик тримера, объединяли, и идентичность пика в качестве белка GP подтверждали с помощью вестерн-блоттинга и SDS-PAGE и/или анализа с помощью аналитической SEC. Концентрацию очищенного GP вируса Эбола и вируса Марбург определяли с помощью измерения оптической плотности при 280 нм и очищенный белок хранили при 4°C до дальнейшего применения.

Пример 2. Улучшенная экспрессия и стабильность растворимых тримеров GP вируса Эбола

[0104] Несколько последовательностей гликопротеина (GP) вируса Эбола выбирали в качестве каркасной последовательности для исследования эффектов различных мутаций в отношении уровней образования тримера GP вируса Эбола. Экспрессию эктодоменов (аминокислоты 1-647, удлиненные с помощью метки His6) гликопротеинов вируса Эбола Заир дикого типа (штаммы Маинга, Макона и Киквит) обеспечивали в клетках ехр1293F. Для каждого из трех видов GP были также получены варианты, в которых отсутствовал муциноподобный домен. Муциноподобный домен образует отдельный периферический домен на каждом протомере. Данный домен является более вариабельным и высокогликозилированным, и существует не много нейтрализующих антител, направленных на него. GP вируса Эбола, в составе которых отсутствует муциноподобный домен, образуют тримеры в конформации до слияния, которые легче анализировать и характеризовать, в отличие от GP, содержащих муциноподобный домен. В случае белка из штамма Маинга осуществляли удаление от аминокислотного остатка 320 до аминокислотного остатка 476. В случае белка из штаммов Макона и Киквит осуществляли удаление от аминокислотного остатка 314 до аминокислотного остатка 472. GP без муциноподобного домена кристаллизовали и рассматривали в качестве потенциальных кандидатов для вакцины. В ходе проведения NativePAGE и SEC-MALS для неочищенных супернатантов выяснили, что основная часть полученных соединений являлась мономерами, в то время как только незначительная фракция представляла собой тримеры. Растворимые белки вируса Эбола, характеризующиеся увеличенной процентной долей образования тримера и наиболее высокими значениями выхода тримера, обладают преимуществом с точки зрения изготовления, поскольку для них потребуются меньший объем мероприятий по очистке и удалению белка оболочки, присутствующего в препарате в нежелательных ненативных конформациях. Более того, они будут представлять более хорошие вставки для вектора.

[0105] Варианты рекомбинантного белка GP подвергали испытанию в отношении образования тримера для идентификации тех мутаций, которые обеспечивали увеличение процентной доли образования тримера и/или увеличение значений выхода тримера по сравнению с каркасной последовательностью. Сначала проводили полу-высокопроизводительный скрининг процентной доли тримера и значений выхода тримера с помощью анализа NativePAGE с применением клеточного супернатанта, загруженного в гель. Результаты NativePAGE подтверждали с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии (SEC) с применением клеточных супернатантов.

Анализ NativePAGE

[0106] NativePAGE проводили в соответствии с протоколом изготовителя (LifeTechnologies) с применением 4-16% градиентных гелей Bis-Tris NativePage (LifeTechnologies). Тример GP с муциноподобным доменом достигал отметки для массы, составлявшей приблизительно 800 кДа, при этом GP без муциноподобного домена

достигал отметки для массы, составлявшей приблизительно 420 кДа. Изначально GP-T577P-T42A без муцина из штамма Макона (FIL161615), SEQ ID NO:16, применяли в качестве каркасной последовательности. Ранее было показано, что T577P обеспечивает повышение выхода тримера (WO 2017/037196), и T42A вводили для нокаута сайта PNGS для обеспечения возможности кристаллизации белка (Zhao et al. Nature. 2016 Jul 7;535(7610):169-172). Результаты NativePAGE, представленные на ФИГ. 2, демонстрируют, что обе из замен K588F и K588W приводили к очевидному повышению выхода тримера, в то время как большинство из испытанных мутаций приводили к снижению выхода тримера.

K588F в штаммах Маинга, Киквит и Макона

Анализ с помощью аналитической SEC

[0107] Также осуществляли испытание на предмет того, обеспечивает ли K588F стабилизацию GP без муциноподобного домена из штамма Макона в отсутствие T42A и T577P и обеспечивает ли она также стабилизацию GP без муциноподобного домена из штаммов Маинга и Киквит. Также испытывали K588F отдельно или в комбинации с T577P в полных эктодоменах GP из штаммов Макона, Маинга и Киквит. Варианты GP из EBOV экспрессировали в культурах клеток в 96-луночном формате. Для проведения эксперимента с помощью аналитической SEC применяли систему для высокоэффективной жидкостной хроматографии (Agilent Technologies) и прибор MiniDAWN TREOS (Wyatt), соединенный с детектором показателя преломления Optilab T-rEX (Wyatt). Осветленные супернатанты вносили в колонку TSK-Gel G3000SWxl (Tosoh Bioscience), уравновешенную с помощью подвижного буфера (150 mM фосфат натрия, 50 mM NaCl, pH 7,0) при 1 мл/мин. Данные анализировали с помощью пакета программного обеспечения Astra 6.

[0108] Хроматограммы, полученные в ходе проведения аналитической SEC для GP вируса Эбола и вариантов, содержащих мутацию T577P, K588F или T577P, комбинированную с K588F, представлены на ФИГ. 3. На хроматограмме для GP присутствовало несколько пиков. Тример полного эктодомена элюируется в момент времени примерно 6,3 минуты, и тример вариантов без муциноподобного домена элюируется в момент времени около 7,5 минуты. На ФИГ. 4 представлена гистограмма, отображающая значения высоты пика тримера, из хроматограмм SEC на ФИГ. 3. Измерение уровня связывания антитела 100, которое преимущественно связывается с тримерными формами GP вируса Эбола, для супернатантов культур клеток проводили с помощью биослойной интерферометрии (BLI) с использованием Octet (ФИГ. 5). Таким образом, уровень связывания антитела 100 в момент времени 10 секунд (выраженная в сдвиге в нм/минуту), является хорошим индикатором наличия правильно свернутых тримеров. Сдвиг в нм в момент времени 600 секунд не характеризуются таким большим размахом значений, как сдвиг в момент времени 10 секунд, что может означать, что антитело 100 обладает способностью индуцировать образование тримера из мономеров в растворе. Уровни связывания в момент времени 10 секунд демонстрирует ранжирование

мутантных форм по уровню содержания тримеров, очень сходное с тем, что наблюдалось при проведении аналитической SEC, таким образом, результаты аналитической SEC были подтверждены с помощью данных BLI.

Биослойная интерферометрия (BLI)

Антитело 100 иммобилизировали на сенсорах к hIgG (АНС) (FortéBio, № по кат. 18-5060) при концентрации 10 мкг/мл в 1х буфере для кинетического анализа (FortéBio, № по кат. 18-1092) в 96-луночных черных полипропиленовых микропланшетах с половинным объемом лунки и плоским дном (FortéBio, № по кат. 3694). Эксперимент проводили с помощью прибора Octet HTX (Pall-FortéBio) при 30°C и скорости встряхивания, составлявшей 1000 об./мин. Активацию проводили в течение 60 с, иммобилизацию антител - в течение 600 с, затем промывали в течение 150 с и после этого осуществляли связывание с Env в течение 600 с с последующей диссоциацией в течение 60 с, встряхивая всю систему при 1000 об./мин. Анализ данных проводили с применением программного обеспечения FortéBio Data Analysis версии 8.1 (FortéBio). Угол наклона кривой связывания определяли в момент времени 10 секунд в нм/минуту.

Пример 3. Наличие гидрофобных остатков в положении 588 обеспечивает повышение выхода тримера

[0109] Замены в положении 588 на фенилаланин, аланин, валин, изолейцин, лейцин, метионин и тирозин для GP из штамма Маинга и GP без муцина из штамма Маинга испытывали с помощью аналитической SEC и BLI (Octet) с использованием антитела 100 (ФИГ. 6). Замены на фенилаланин, валин, изолейцин, лейцин, метионин и тирозин обеспечивали значительное повышение значений выхода тримера. Замены на аланин и триптофан не обеспечивали такого повышения выхода тримера для GP без муцина из штамма Маинга. Для GP без муцина из штамма Маинга проводили испытание всех остальных возможных аминокислотных замен, но ни одна из дополнительных возможных замен не приводила к повышению выхода тримера (ФИГ. 6)

Пример 4. Стабильность тримерных форм GP вируса Марбург

Замена в положении 588 стабилизирует GP вируса Марбург

[0110] С целью установления универсального характера стабилизирующей замены для остальных представителей семейства Filoviridae замену в положении 588 также вводили в последовательность GP вируса Марбург, которая характеризуется идентичностью с последовательностью GP вируса Эбола, составляющей только ~32%. Положение, гомологичное положению 588 в последовательности GP вируса Эбола, соответствует положению 589 в последовательности GP вируса Марбург (SEQ ID NO:43). Однако, с учетом того, что авторы применяют нумерацию в соответствии с нумерацией GP изолята Маинга (Z/Zaire/Yambuku/1976/057935), SEQ ID NO:1 (Sanchez, A. et al. 1996 PNAS США 93:3602-3607), в данном документе авторы настоящего изобретения упоминают его как положение 588. В качестве каркасной последовательности (FIL171592, SEQ ID NO: 27) авторы настоящего изобретения применяли последовательность GP вируса Марбург с делецией муциноподобного домена и четырьмя мутациями, а именно

F438L, W439A, F445G и F447N, для увеличения уровня расщепления фурином (Hashiguchi et al. Cell, 2015 160, 904-912, 26 февраля), которую в данном документе авторы настоящего изобретения упоминают как GP без муцина вируса Марбург. Наличие замен H588F и H588I в GP без муцина вируса Марбург оказывало очень благоприятный эффект в отношении нативного сворачивания тримера GP без муцина вируса Марбург. Из не подвергавшегося мутациям GP без муцина вируса Марбург получали в основном агрегаты, но в противоположность этому, в особенности, с помощью H588I получали намного меньше агрегатов и более чистый пик продукта (FIG. 7). Наличие мутаций H588I/F обеспечивало повышение выхода тримера и процентной доли тримеров для GP без муцина вируса Марбург.

[0111] В вышеприведенных примерах продемонстрировано, что в настоящем изобретении представлен универсальный подход для оптимизации сворачивания и стабильности закрытых тримерных белков из GP филовируса в конформации до слияния.

[0112] Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены только для целей иллюстрации, и что в вышеописанных вариантах осуществления можно будет выполнять изменения без отступления от их общего изобретательского замысла. Таким образом, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными раскрытыми вариантами осуществления, но предусматривает охват модификаций в рамках сущности и объема настоящего изобретения, определенных в прилагаемых пунктах формулы изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Последовательности каркасных последовательностей и мутантных форм для применения в испытаниях замен

SEQ ID NO: 1 (NP_066246.1 шиповидный гликопротеин [вирус Эбола Заир] (изолят Z/Zaire/Yambuku/1976/057935)) (сигнальная последовательность обозначена жирным курсивом)

MGVTGILQLPRDRF KRTSFFLWVILF QRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRD
 KLSSTNQLRSVGLNL
 EGNVATDVPSATKRWGFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLP
 AAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTGPCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVA
 FLILPQAKKDFSSHPLREPVNATEDPSSGYYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQ
 LESRFTPQFLLQLNETIYTSGKRSNTTGKLIWKVNPE
 IDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTVVSNGAKNISGQSPARTSSDPGTNTTT
 EDHKIMASENSSAM
 VQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSPQSLTTKPGPDNSTHNTVPYKLDISEATQVE
 QHHRRTDNDSTASDT
 PSATTAAGPPKAENTNTSKSTDFLDPATTTSPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESAS
 SGKLGLITNTIAGVA
 GLITGRRTRREAIVNAQPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIE
 GLMHNQDGLICGLRQ

LANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHDWT
KNITDKIDQIIHDF

VDKTLPDQGDNDNWWTGWRQWIPAGIGVTGVIIAVIALFCICKFVF

SEQ ID NO: 2 (FIL150282 GP-647 из штамма Маинга) (муциноподобный домен подчеркнут)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTIVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTVVSNGAKNISGQSPART
SSDPGTNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSPQSLTTKPGPDN
STHNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPSATTAAGPPKAENTNTSKSTDFLDP
ATTTSPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGRRTRREAIVN
AQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIEGLMHNQDGLICGLRQLANET
TQALQLFLRATTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHDWTKNITDKIDQII
HDFVDKTLPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 3 (FIL180011 GP-647 из штамма Маинга, T577P) (введенная мутация выделена серым)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTIVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTVVSNGAKNISGQSPART
SSDPGTNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSPQSLTTKPGPDN
STHNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPSATTAAGPPKAENTNTSKSTDFLDP
ATTTSPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGRRTRREAIVN
AQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIEGLMHNQDGLICGLRQLANET
TQALQLFLRATPELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHDWTKNITDKIDQII
HDFVDKTLPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 4 (FIL170497 GP-647 из штамма Маинга, K588F) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTIVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTVVSNGAKNISGQSPART
SSDPGTNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSPQSLTTKPGPDN
STHNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPSATTAAGPPKAENTNTSKSTDFLDP
ATTTSPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGRRTRREAIVN
AQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIEGLMHNQDGLICGLRQLANET

TQALQLFLRATTELRTFSILNRFAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHDWTKNITDKIDQII
HDFVDKTLPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 5 (FIL180012 GP-647 из штамма Маинга -T577P, K588F) (введенные мутации выделены серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
TEDPSSGYYSTTIRYQATGFGTNETEYLFVVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTVVSNGAKNISGQSPART
SSDPGTNTTTEDEHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSPQSLTTKPGPDN
STHNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPSATAAGPPKAENTNTSKSTDFLDP
ATTTSPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGRRTRREAIVN
AQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIEGLMHNQDGLICGLRQLANET
TQALQLFLRATPELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHDWTKNITDKIDQII
HDFVDKTLPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 6 (FIL150351 GP-647 из штамма Маинга без муциноподобного домена (Δ320-476))

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRWGFRSG
VPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTGPCAG
DFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNATEDP
SSGYYSTTIRYQATGFGTNETEYLFVVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKRSNTT
GKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTVVSNGAKNISGKLGLITNTIAG
VAGLITGRRTRREAIVNAQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIEGL
MHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPD
CCIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 7 (FIL180018 GP-647 из штамма Маинга без муциноподобного домена (Δ320-476), T577P) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
TEDPSSGYYSTTIRYQATGFGTNETEYLFVVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTVVSNGAKNISGKLGLITN
TIAGVAGLITGRRTRREAIVNAQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYI
EGLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATPELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHIL
GPDCCIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 8 (FIL170500 GP-647 из штамма Маинга без муциноподобного домена (Δ320-476), K588F) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA

TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTVVSNGAKNISGKLGLITN
 TIAGVAGLITGRRTRREAIVNAQPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYI
 EGLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRFAIDFLLQRWGGTCHIL
 GPDCCIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 9 (FIL180019 GP-647 из штамма Маинга без муциноподобного домена (Δ320-476), T577P) (введенные мутации выделены серым цветом)

IPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTVVSNGAKNISGKLGLITN
 TIAGVAGLITGRRTRREAIVNAQPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYI
 EGLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATPELRTFSILNRFAIDFLLQRWGGTCHIL
 GPDCCIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 10 (FIL150352 GP-647 из штамма Макона) (муциноподобный домен подчеркнут)

IPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSVTKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYASGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTAVSNGGPKNISGQSPARTS
SDPETNTTNEDKIMASENSSAMVQVHSQGRKAAVSHLTTLATISTSPQPPTTKTGPDNS
THNTPVYKLDISEATQVGQHHRRADNDSTASDTPPATTAAGPLKAENTNTSKSADSLDL
ATTTSPQNYSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGRRTRREVIVN
 AQPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYTEGLMHNQDGLICGLRQLANE
 TTQALQLFLRATTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHDWTKNITDKIDQ
 IIHDFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 11 (FIL150409 GP-647 из штамма Макона, T577P) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSVTKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYASGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTAVSNGPKNISGQSPARTS
 SDPETNTTNEDKIMASENSSAMVQVHSQGRKAAVSHLTTLATISTSPQPPTTKTGPDNS
THNTPVYKLDISEATQVGQHHRRADNDSTASDTPPATTAAGPLKAENTNTSKSADSLDL
ATTTSPQNYSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGRRTRREVIVN
 AQPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYTEGLMHNQDGLICGLRQLANE
 TTQALQLFLRATPELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHDWTKNITDKIDQ

IHDFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 12 (FIL170494 GP-647 из штамма Макона, K588F) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSVTKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYASGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTA VSNGPKNISGQSPARTS
 SDPETNTTNEDEHKIMASENSSAMVQVHSQGRKAAVSHLTTLATISTSPQPPTTKTGPDNS
 THNTPVYKLDISEATQVGQHHRRADNDSTASDTPPATTAAGPLKAENTNTSKSADSLDL
 ATTTSPQNYSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGRRTRREVIVN
 AQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYTEGLMHNQDGLICGLRQLANE
 TTQALQLFLRATTELRTFSILNRFAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHDWTKNITDKIDQI
 IHDFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 13 (FIL170495 GP-647 из штамма Макона, T577P, K588F) (введенные мутации выделены серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSVTKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYASGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTA VSNGPKNISGQSPARTS
 SDPETNTTNEDEHKIMASENSSAMVQVHSQGRKAAVSHLTTLATISTSPQPPTTKTGPDNS
 THNTPVYKLDISEATQVGQHHRRADNDSTASDTPPATTAAGPLKAENTNTSKSADSLDL
 ATTTSPQNYSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGRRTRREVIVN
 AQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYTEGLMHNQDGLICGLRQLANE
 TTQALQLFLRATPELRTFSILNRFAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHDWTKNITDKIDQI
 IHDFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 14 (FIL150396 GP-647 из штамма Макона без муциноподобного домена (Δ314-472))

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSVTKRWGFRSG
 VPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTGPCAG
 DFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNATEDP
 SSGYYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYASGKRSNTT
 GKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTA VSNSASSGKLGLITNTIAGVA
 GLITGRRTRREVIVNAQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYTEGLMH
 NQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCI
 EPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 15 (FIL161614 GP-647 из штамма Макона без муциноподобного домена (Δ314-472), T577P) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSVTKRW

GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTIVQLESRFTPQFLLQLNETIYASGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTAVSNSASSGKLGITNTI
 AGVAGLITGRRRTRREVIVNAQPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYTE
 GLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATPELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILG
 PDCCIEPHDWTKNITDKIDQIHDVFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 16 (FIL161615 GP-647 из штамма Макона без муциноподобного домена (Δ314-472), T577P, T42A) (введенные мутации выделены серым цветом)

IPLGVIIHNSALQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSVTKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTIVQLESRFTPQFLLQLNETIYASGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTAVSNSASSGKLGITNTI
 AGVAGLITGRRRTRREVIVNAQPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYTE
 GLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATPELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILG
 PDCCIEPHDWTKNITDKIDQIHDVFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 17 (FIL170496 GP-647 из штамма Макона без муциноподобного домена (Δ314-472), K588F) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIIHNSLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSVTKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTIVQLESRFTPQFLLQLNETIYASGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTAVSNSASSGKLGITNTI
 AGVAGLITGRRRTRREVIVNAQPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYTE
 GLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRFAIDFLLQRWGGTCHILG
 PDCCIEPHDWTKNITDKIDQIHDVFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 18 (FIL180022 GP-647 из штамма Макона без муциноподобного домена (Δ314-472), T577P, K588F) (введенные мутации выделены серым цветом)

IPLGVIIHNSLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSVTKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTIVQLESRFTPQFLLQLNETIYASGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTAVSNSASSGKLGITNTI
 AGVAGLITGRRRTRREVIVNAQPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYTE
 GLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATPELRTFSILNRFAIDFLLQRWGGTCHILG
 PDCCIEPHDWTKNITDKIDQIHDVFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 19 (FIL150349 GP-647 из штамма Киквит) (муциноподобный домен подчеркнут)

IPLGVIIHNSLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW

GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTA VSNRAKNISGQSPARTS
SDPGTNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSPQPPTTKPGPDNS
THNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPPATTAAGPLKAENTNTSKGTDLLDP
ATTTSPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGGRRARREAIVN
 AQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIEGLMHNQDGLICGLRQLANET
 TQALQLFLRATTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCEPHDWTKNITDKIDQII
 HDFVDKTLPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 20 (FIL180013 GP-647 из штамма Киквит, T577P) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTA VSNRAKNISGQSPARTS
 SDPGTNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSPQPPTTKPGPDNS
 THNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPPATTAAGPLKAENTNTSKGTDLLDP
 ATTTSPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGGRRARREAIVN
 AQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIEGLMHNQDGLICGLRQLANET
 TQALQLFLRATPELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCEPHDWTKNITDKIDQII
 HDFVDKTLPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 21 (FIL170498 GP-647 из штамма Киквит, K588F) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTA VSNRAKNISGQSPARTS
 SDPGTNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSPQPPTTKPGPDNS
 THNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPPATTAAGPLKAENTNTSKGTDLLDP
 ATTTSPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGGRRARREAIVN
 AQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIEGLMHNQDGLICGLRQLANET
 TQALQLFLRATTELRTFSILNRFAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCEPHDWTKNITDKIDQII
 HDFVDKTLPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 22 (FIL180014 GP-647 из штамма Киквит, T577P, K588F) (введенные мутации выделены серым цветом)

IPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG

PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTAVSNRAKNISGQSPARTS
 SDPGTNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSPQPPTTKPGPDNS
 THNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPPATTAAGPLKAENTNTSKGTDLLDP
 ATTTSPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGGRRARREAIVN
 AQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIEGLMHNQDGLICGLRQLANET
 TQALQLFLRATPELRTFSILNRFAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHDWTKNITDKIDQII
 HDFVDKTLDPQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 23 (FIL150350 GP-647 из штамма Киквит без муциноподобного домена (Δ314-472))

IPLGVHINSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTAVSNSASSGKLGLITNTI
 AGVAGLITGGRRARREAIVNAQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIE
 GLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILG
 PDCCIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLDPQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 24 (FIL180020 GP-647 из штамма Киквит без муциноподобного домена (Δ314-472), T577P) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVHINSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTAVSNSASSGKLGLITNTI
 AGVAGLITGGRRARREAIVNAQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIE
 GLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATPELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILG
 PDCCIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLDPQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 25 (FIL170499 GP-647 из штамма Киквит без муциноподобного домена (Δ314-472), K588F) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVHINSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTAVSNSASSGKLGLITNTI
 AGVAGLITGGRRARREAIVNAQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIE
 GLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRFAIDFLLQRWGGTCHILG
 PDCCIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLDPQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 26 (FIL180021 GP-647 из штамма Киквит без муциноподобного

домена (Δ 314-472), T577P, K588F) (введенные мутации выделены серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFVNDLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTA VSN SASSGKLGITNTI
 AGVAGLITGGRRARREAI VNA QPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIE
 GLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATPELRTFSILNRFAIDFLLQRWGGTCHILG
 PDCCIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 27 (FIL171592 GP-637 вируса Марбург (MARV) без муциноподобного домена (Δ 255-423))

LPVLEIASNSQPQDVDSVCSGTLQKTEDVHLMGFTLSGQKVADSPLEASKRWAF
 RTGVPPKNVEYTEGEEAKTCYNISVTDPSGKSLLLDPPSNIRDYPKCKTVHHIQGQNP
 HAAQGIALHLWGAFFLYDRVASTTMYRGKVFTEGNIAAMIVNKTVHRMIFSRQGGYRHM
 NLTSTNKYWTSSNETQRNDTGCFGILQEYNSTNNQTCPPSLKPPSLPTVTPSIHSTNTQIN
 TAKSGTRPPIYFRKKRSILAKEGDIGPNLDGLINTEIDFDPIPNTETIFDESPSNTSTNEEQ
 HTPPNISLTFYFPDKNGDTAYSGENENDCDAELRIWSVQEDDLAAGLSWIPFFGPGIEG
 LYTAGLIKNQNNLVCRLRRLANQTAKSLELLLRVTTEERTFSLINRHAIIDFLLTRWGGTC
 KVLGPDCCIGIEDLSKNISEQIDKIRKDEQKEETG

SEQ ID NO: 28 (FIL172545 GP-647 из штамма Маинга, K588A) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFVNDLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTVVSNGAKNISGQSPART
 SSDPGTNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSPQSLTTKPGPDN
 STHNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPSATTAAAGPPKAENTNTSKSTDFLDP
 ATTTSPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGITNTIAGVAGLITGGRRTRREAI V N
 A QPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIEGLMHNQDGLICGLRQLANET
 TQALQLFLRATTELRTFSILNRAAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHDWTKNITDKIDQII
 HDFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 29 (FIL172546 GP-647 из штамма Маинга, K588V) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFVNDLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTVVSNGAKNISGQSPART
 SSDPGTNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSPQSLTTKPGPDN

STHNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPSATTAAGPPKAENTNTSKSTDFLDP
 ATTTSPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGRRTRREAIVN
 AQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIEGLMHNQDGLICGLRQLANET
 TQALQLFLRATTELRTFSILNRVAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHDWTKNITDKIDQII
 HDFVDKTLPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 30 (FIL172547 GP-647 из штамма Маинга, K588I) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTVVSNGAKNISGQSPART
 SSDPGTNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSPQSLTTKPGPDN
 STHNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPSATTAAGPPKAENTNTSKSTDFLDP
 ATTTSPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGRRTRREAIVN
 AQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIEGLMHNQDGLICGLRQLANET
 TQALQLFLRATTELRTFSILNRIAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHDWTKNITDKIDQII
 HDFVDKTLPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 31 (FIL172548 GP-647 из штамма Маинга, K588L) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTVVSNGAKNISGQSPART
 SSDPGTNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSPQSLTTKPGPDN
 STHNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPSATTAAGPPKAENTNTSKSTDFLDP
 ATTTSPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGRRTRREAIVN
 AQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIEGLMHNQDGLICGLRQLANET
 TQALQLFLRATTELRTFSILNRLAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHDWTKNITDKIDQII
 HDFVDKTLPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 32 (FIL172549 GP-647 из штамма Маинга, K588M) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTVVSNGAKNISGQSPART
 SSDPGTNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSPQSLTTKPGPDN
 STHNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPSATTAAGPPKAENTNTSKSTDFLDP

ATTTSPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGRRTRREAIVN
 AQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIEGLMHNQDGLICGLRQLANET
 TQALQLFLRATTELRTFSILNRMAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHDWTKNITDKIDQI
 IHDFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 33 (FIL172550 GP-647 из штамма Маинга, K588Y) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTIVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTVVSNGAKNISGQSPART
 SSDPGTNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSPQSLTTKPGPDN
 STHNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDSTASDTPSATAAGPPKAENTNTSKSTDFLDP
 ATTTSPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGRRTRREAIVN
 AQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYIEGLMHNQDGLICGLRQLANET
 TQALQLFLRATTELRTFSILNRYAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHDWTKNITDKIDQII
 HDFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 34 (FIL172532 GP-647 из штамма Маинга без муциноподобного домена (Δ320-476), K588A) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTIVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTVVSNGAKNISGKLGLITN
 TIAGVAGLITGRRTRREAIVNAQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYI
 EGLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRAAIDFLLQRWGGTCHIL
 GPDCCIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 35 (FIL172533 GP-647 из штамма Маинга без муциноподобного домена (Δ320-476), K588V) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTIVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTKIRSEELSFTVVSNGAKNISGKLGLITN
 TIAGVAGLITGRRTRREAIVNAQPKNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYI
 EGLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRVAIDFLLQRWGGTCHIL
 GPDCCIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 36 (FIL172534 GP-647 из штамма Маинга без муциноподобного домена (Δ320-476), K588I) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW

GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTIVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTVVSNGAKNISGKLGLITN
 TIAGVAGLITGRRTRREAIVNAQPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYI
 EGLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRIAIDFLLQRWGGTCHIL
 GPDCCIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 37 (FIL172535 GP-647 из штамма Маинга без муциноподобного домена (Δ320-476), K588L) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTIVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTVVSNGAKNISGKLGLITN
 TIAGVAGLITGRRTRREAIVNAQPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYI
 EGLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRLAIDFLLQRWGGTCHIL
 GPDCCIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 38 (FIL172536 GP-647 из штамма Маинга без муциноподобного домена (Δ320-476), K588M) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTIVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTVVSNGAKNISGKLGLITN
 TIAGVAGLITGRRTRREAIVNAQPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYI
 EGLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRMAIDFLLQRWGGTCHIL
 GPDCCIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLDPDQGDNDNWWTG^H

SEQ ID NO: 39 (FIL172537 GP-647 из штамма Маинга без муциноподобного домена (Δ320-476), K588Y) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW
 GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTIVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGKR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTVVSNGAKNISGKLGLITN
 TIAGVAGLITGRRTRREAIVNAQPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYI
 EGLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRYAIDFLLQRWGGTCHIL
 GPDCCIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLDPDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 40 (FIL180327 GP-647 из штамма Маинга без муциноподобного домена (Δ320-476), K588W) (введенная мутация выделена серым цветом)

IPLGVIIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRW

GFRSGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPRCRYVHKVSGTG
 PCAGDFAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNA
 TEDPSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTYVQLESRFTPQFLLQLNETIYTSGR
 SNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTVVSNGAKNISGKLGLITN
 TIAGVAGLITGRRTRREAIVNAQPKCNPNLHYWTTQDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYI
 EGLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRWAIDFLLQRWGGTCHI
 LGPDCCIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLPLDQGDNDNWWTG

SEQ ID NO: 41 (FIL171593 GP-637 вируса Марбург (MARV) без муциноподобного домена (Δ255-423), H588F) (введенная мутация выделена серым цветом)

LPVLEIASNSQPQDVDSVCSGTLQKTEDVHLMGFTLSGQKVADSPLEASKRWA
 RTGVPPKNVEYTEGEEAKTCYNISVTDPSGKSLLLDPPSNIRDYPKCKTVHHIQGQNP
 HAAQGIALHLWGAFFLYDRVASTTMYRGKVFTEGNIAAMIVNKTVHRMIFSRQGGQYRHM
 NLTSTNKYWTSSNETQRNDTGCFGILQEYNSTNNQTCPPSLKPPSLPTVTPSIHSTNTQIN
 TAKSGTRPPIYFRKKRSILAKEGDIGPNLDGLINTEIDFDPIPNTETIFDESPSFNTSTNEEQ
 HTPPNISLTFSYFPDKNGDTAYSGENENDCDAELRIWSVQEDDLAAGLSWIPFFGPGIEG
 LYTAGLIKNQNNLVCRLRRLANQTAKSLELLLRVTTEERTFSLINRFAIDFLLTRWGGTC
 KVLGPDCCIGIEDLSKNISEQIDKIRKDEQKEETG

SEQ ID NO: 42 (FIL171594 GP-637 вируса Марбург (MARV) без муциноподобного домена (Δ255-423), H588I) (введенная мутация выделена серым цветом)

LPVLEIASNSQPQDVDSVCSGTLQKTEDVHLMGFTLSGQKVADSPLEASKRWA
 RTGVPPKNVEYTEGEEAKTCYNISVTDPSGKSLLLDPPSNIRDYPKCKTVHHIQGQNP
 HAAQGIALHLWGAFFLYDRVASTTMYRGKVFTEGNIAAMIVNKTVHRMIFSRQGGQYRHM
 NLTSTNKYWTSSNETQRNDTGCFGILQEYNSTNNQTCPPSLKPPSLPTVTPSIHSTNTQIN
 TAKSGTRPPIYFRKKRSILAKEGDIGPNLDGLINTEIDFDPIPNTETIFDESPSFNTSTNEEQ
 HTPPNISLTFSYFPDKNGDTAYSGENENDCDAELRIWSVQEDDLAAGLSWIPFFGPGIEG
 LYTAGLIKNQNNLVCRLRRLANQTAKSLELLLRVTTEERTFSLINRIAIDFLLTRWGGTC
 KVLGPDCCIGIEDLSKNISEQIDKIRKDEQKEETG

SEQ ID NO: 43 (GP MARV (вируса Марбург) (эктодомен GP вируса Марбург, муциноподобный домен подчеркнут) (сигнальная последовательность обозначена жирным курсивом)

MKTIYFLISLILIQSIKTLLPVLEIASNSQPQDVDSVCSGTLQKTEDVHLMGFTLSGQ
 KVADSPLEASKRWA**FRTGVPPKNVEYTEGEEAKTCYNISVTDPSGKSLLLDPPSNIRDYP**
 KCKTVHHIQGQNP**HAAQGIALHLWGAFFLYDRVASTTMYRGKVFTEGNIAAMIVNKT**VH
 RMIFSRQGGQYRHM**NLTSTNKYWTSSNETRRNDTGCFGILQEYNSTNNQTCSPSLKPPS**
 LPTVTPSIHSTNTQIN**TAKSGTINPSSDDEDLMVSGSGSGEQGPHTTLNVVTEQKQSS****TIL**
STPSLHPSTPQHEQNSTNPSRHAVTEHNGTDPTTQPATLLNNTNTTPTYNTLKYNLSTPS
PPTRNITNNDTQRELAESEQTNAQLNTTPDPTENPTTAQDTNSTTNITMTSDITSKHPTN
SSPDSSPTTRPPIYFRKKRSIFWKEGDIFPFLDGLINTEIDFDPIPNTETIFDESPSFNTSTNEE
 QHTPPNISLTFSYFPDKNGDTAYSGENENDCDAELRIWSVQEDDLAAGLSWIPFFGPGIE
 GLYTAGLIKNQNNLVCRLRRLANQTAKSLELLLRVTTEERTFSLINRHAIDFLLTRWGGT

CKVLGPDCCIGIEDLSKNISEQIDKIRKDEQKEETG

SEQ ID NO: 44 Сигнальный пептид GP вируса Эбола

MGVTGILQLPRDRFKRTSFFLWVILFQRTFS

SEQ ID NO: 45 Сигнальный пептид GP вируса Марбург

MKTIYFLISLILIQSIKT

ЛИТЕРАТУРНЫЕ ИСТОЧНИКИ

Sanchez, A. et al. 1996 PNAS США 93:3602-3607

Friedrich et al., Viruses. 2012 Sep;4(9):1619-50

Wang et al. Cell. 2016 Jan 14;164(1-2):258-268

Bornholdt et al. MBio. 2016 Feb 23;7(1):e02154-15

Pallesen et al. Nat Microbiol. 2016 Aug 8;1(9):16128

Lee et al. Nature. 2008 Jul 10;454(7201):177-82

Sanchez et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Apr 16;93(8):3602-7

Eglen et al. Curr. Chem. *Геномныйс*, 2008, 25(1): 2-10

WO 2007/104792

Abbink et al., (2007) Virol. 81(9): 4654-63

Kushnir et al., Vaccine. 2012 Dec 17;31(1):58-83

Bale et al, J Virol. 2017 Jul 27;91(16). pii: e00443-17

Zhao L, et al (2014) Vaccine 32: 327-337

López-Sagaseta et al, Comput Struct Biotechnol J. 2015 Nov 26;14:58-68

Zhao et al. Nature. 2016 Jul 7;535(7610):169-172

Hashiguchi et al. Cell, 2015 Feb 26;160:904-912

US 2015/0291935

WO 2014/124301

US 2016/0122392

WO 2017/037196

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный гликопротеин филловируса, содержащий незаряженный аминокислотный остаток в положении 588, где нумерация положений соответствует нумерации GP в изоляте Z/Zaire/Yambuku/1976/057935, и где незаряженный аминокислотный остаток не является цистеином.

2. Рекомбинантный гликопротеин филловируса по п.1, где незаряженный аминокислотный остаток представляет собой гидрофобный аминокислотный остаток, выбранный из группы F, I, A, L, M, V, W и Y.

3. Рекомбинантный гликопротеин филловируса по п.2, где гидрофобный аминокислотный остаток выбран из группы F, I, L, M, V и Y.

4. Рекомбинантный гликопротеин филловируса по п.2, где гидрофобный аминокислотный остаток представляет собой F.

5. Рекомбинантный гликопротеин филловируса по любому из пп. 1-4, дополнительно содержащий аминокислотный остаток R в положении 577 и/или 579, где нумерация положений соответствует нумерации GP в изоляте Z/Zaire/Yambuku/1976/057935.

6. Рекомбинантный гликопротеин филловируса по любому из пп. 1-5, где филловирин относится к штамму, выбранному из группы Маинга, Макона, Киквит, Судан Гулу и Марбург.

7. Рекомбинантный гликопротеин филловируса по любому из пп. 1-6, где гликопротеин филловируса выбран из группы, состоящей из

1) гликопротеина из штамма Маинга вируса Эбола Заир, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, или гликопротеина из штамма Маинга вируса Эбола Заир с делецией от аминокислотного остатка 320 до аминокислотного остатка 476, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; и

2) гликопротеина GP из штамма Макона вируса Эбола Заир, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, или гликопротеина GP из штамма Макона вируса Эбола Заир с делецией от аминокислотного остатка 314 до аминокислотного остатка 472, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14; и

3) гликопротеина из штамма Киквит вируса Эбола Заир, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, или гликопротеина из штамма Киквит вируса Эбола Заир с делецией от аминокислотного остатка 314 до аминокислотного остатка 472, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23; и

4) гликопротеина вируса Марбург с делецией от аминокислотного остатка 255 до аминокислотного остатка 423, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27,

где нумерация положений соответствует нумерации GP в изоляте Z/Zaire/Yambuku/1976/057935.

8. Тримерный комплекс, содержащий нековалентно связанный олигомер, состоящий из трех рекомбинантных гликопротеинов филовируса по любому из пп. 1-7.

9. Частица, предпочтительно наночастица, на поверхности которой представлен рекомбинантный гликопротеин филовируса по любому из пп. 1-7 или тримерный комплекс по п.8.

10. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный гликопротеин филовируса по любому из пп. 1-7.

11. Вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.10, функционально связанную с промотором.

12. Вектор по п.11, где вектор представляет собой аденовирусный вектор.

13. Клетка-хозяин, содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.10 или вектор по п.11 или 12.

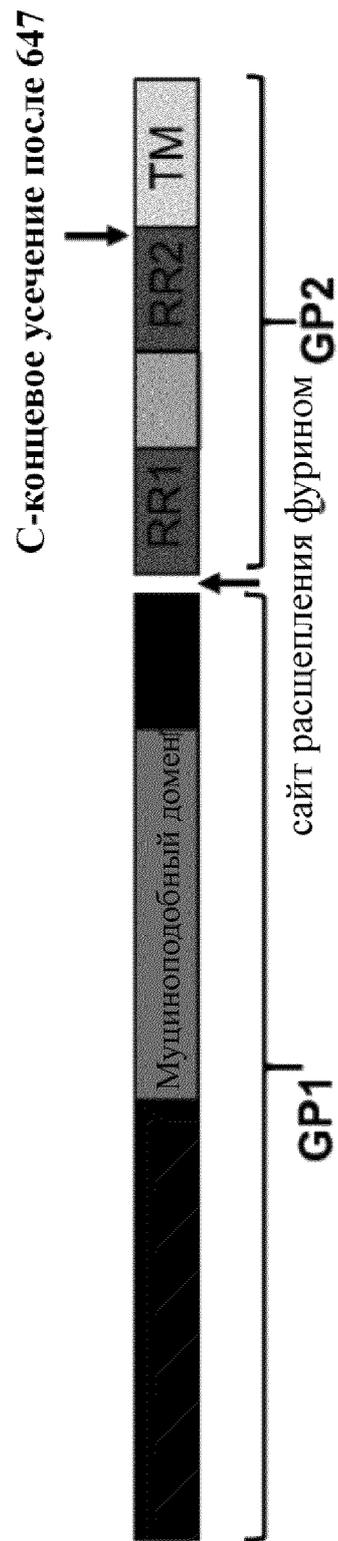
14. Способ получения рекомбинантного гликопротеина филовируса, включающий выращивание клетки-хозяина по п. 13 в условиях, подходящих для получения рекомбинантного гликопротеина филовируса.

15. Композиция, содержащая рекомбинантный гликопротеин филовируса по любому из пп. 1-7, тримерный комплекс по п.8, частицу по п.9, выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.10 или вектор по п.11 или 12 и фармацевтически приемлемый носитель.

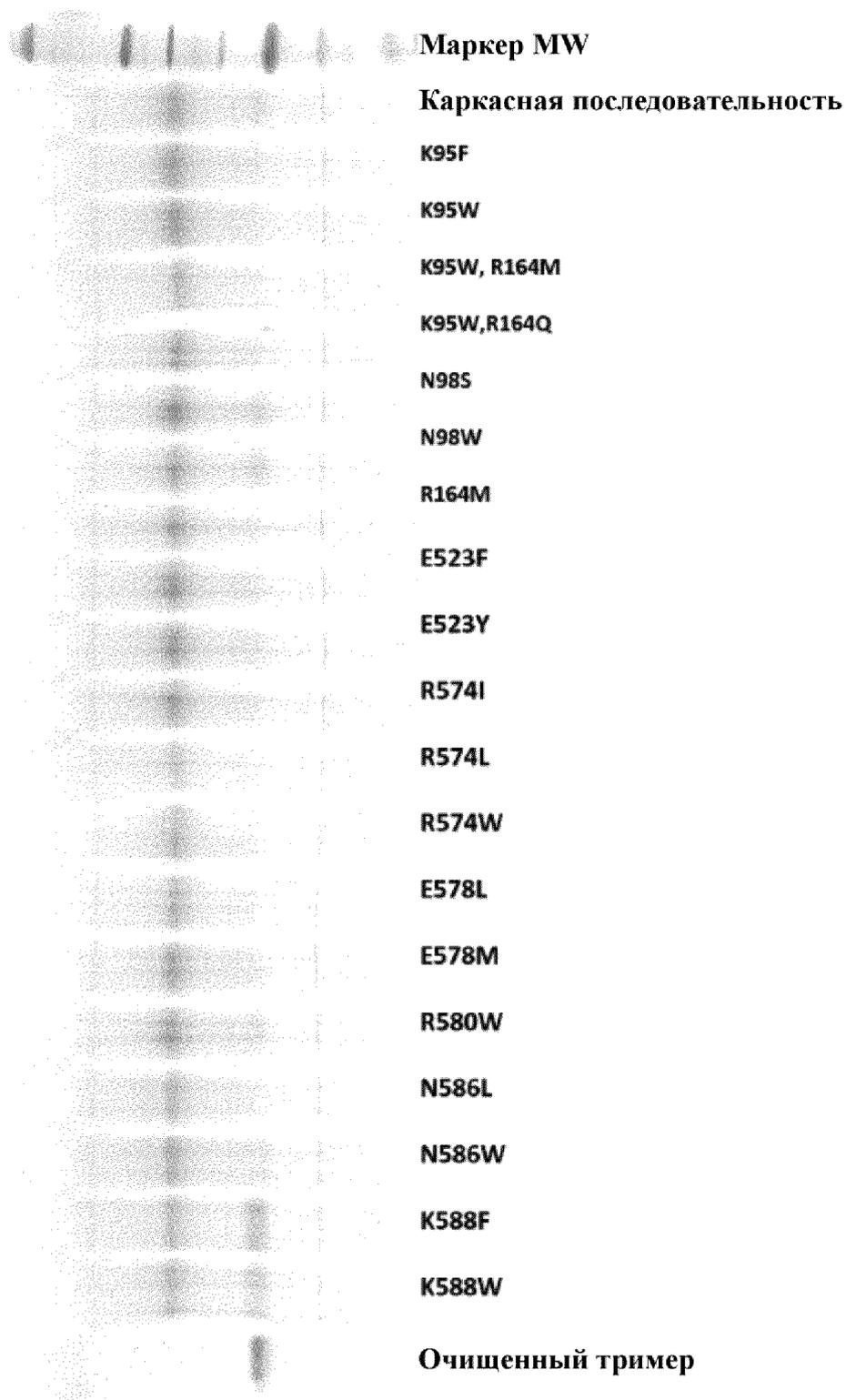
16. Способ увеличения уровня образования тримера гликопротеина филовируса, включающий замену аминокислотного остатка в положении 588 последовательности гликопротеина на незаряженный аминокислотный остаток, причем нумерация положений соответствует нумерации GP в изоляте Z/Zaire/Yambuku/1976/057935, и причем незаряженный аминокислотный остаток не представляет собой цистеин.

17. Способ по п.16, где способ дополнительно включает замену аминокислотного остатка в положении 577 и/или 579 последовательности гликопротеина на остаток R, причем нумерация положений соответствует нумерации GP в изоляте Z/Zaire/Yambuku/1976/057935.

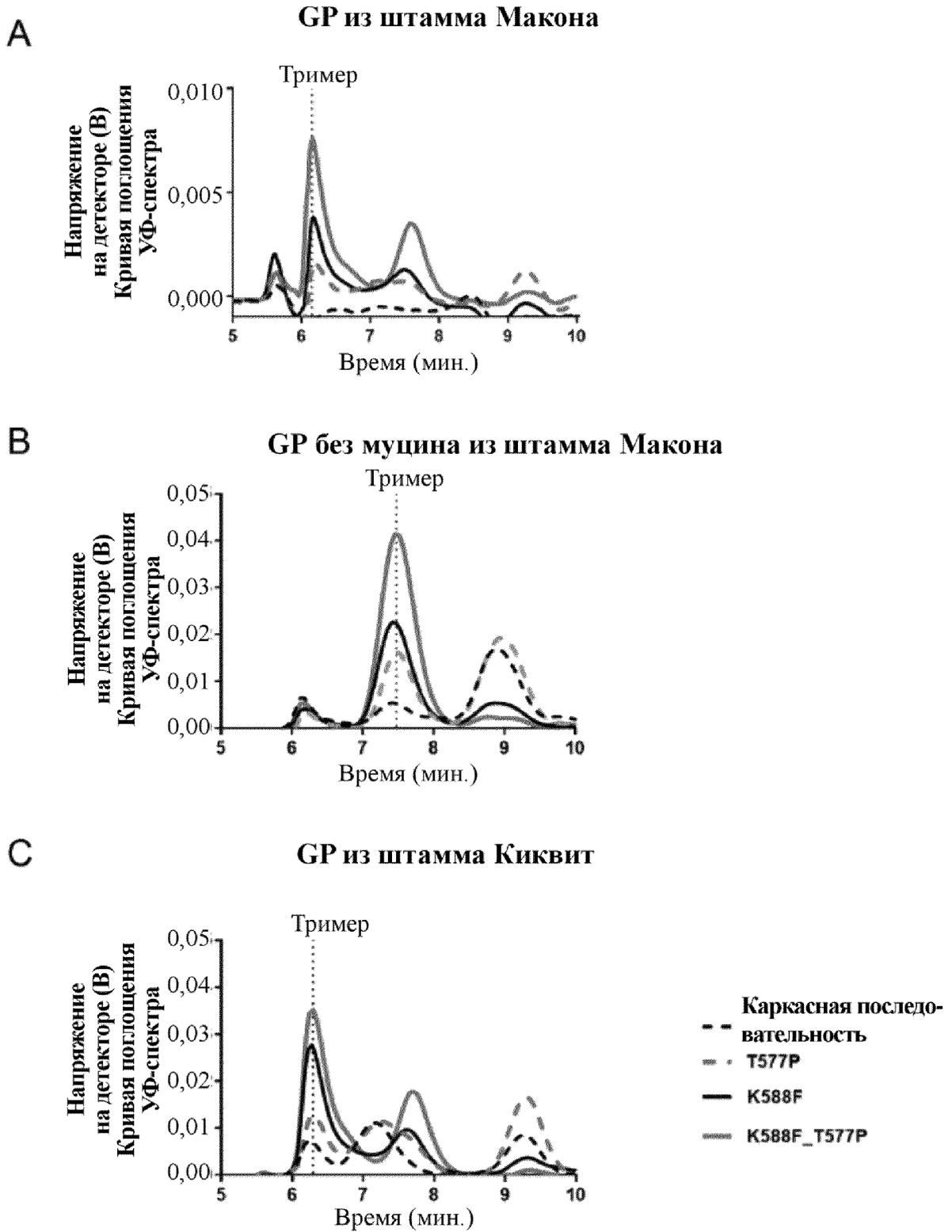
По доверенности



ФИГ. 1



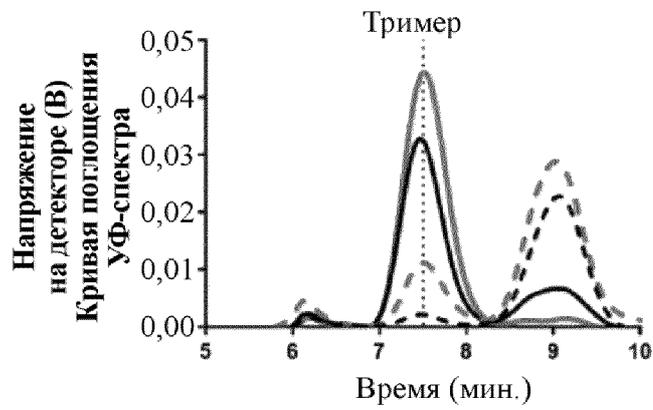
ФИГ. 2



ФИГ. 3

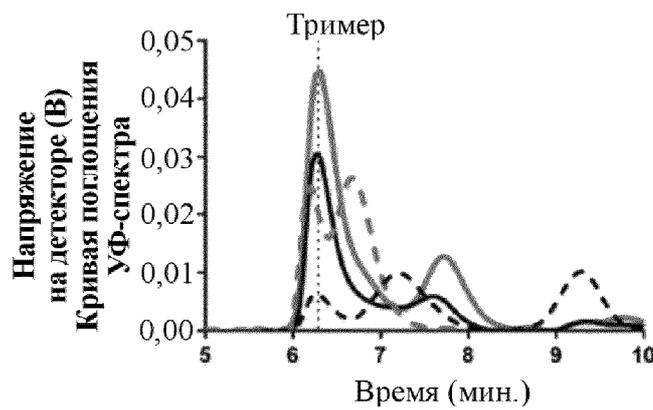
D

GP без муцина из штамма Киквит



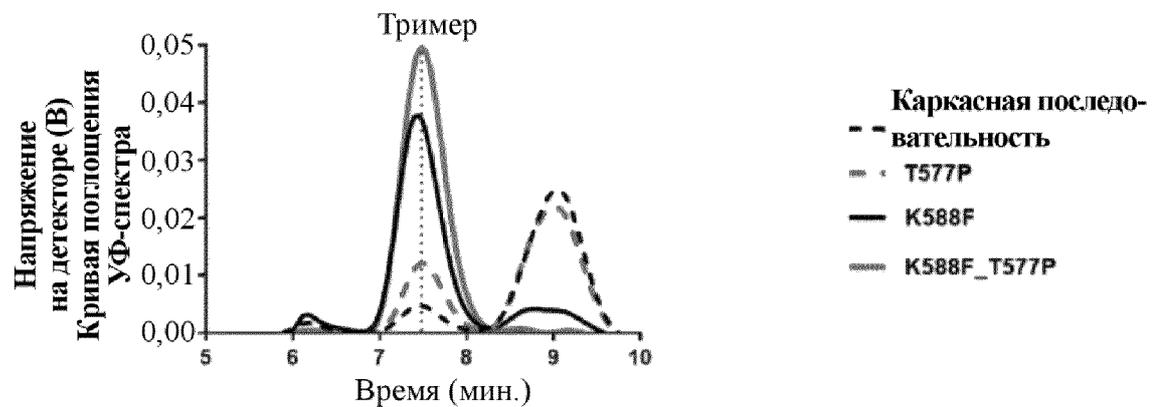
E

GP из штамма Маинга



F

GP без муцина из штамма Маинга



ФИГ. 3 - продолжение

5/13

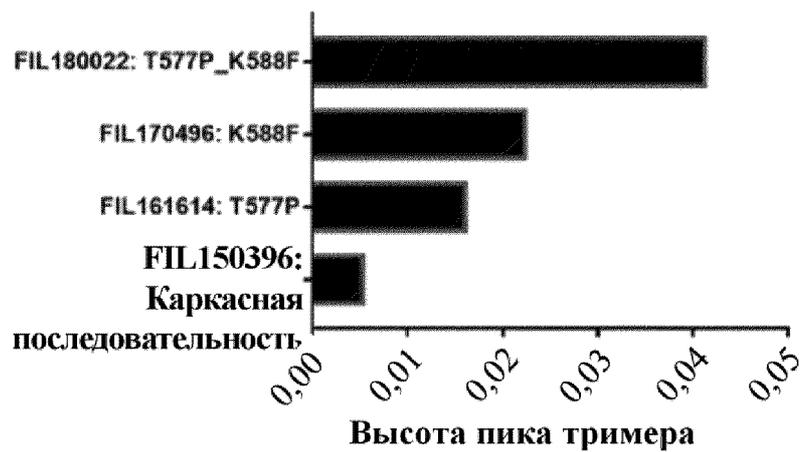
A

GP из штамма Макона



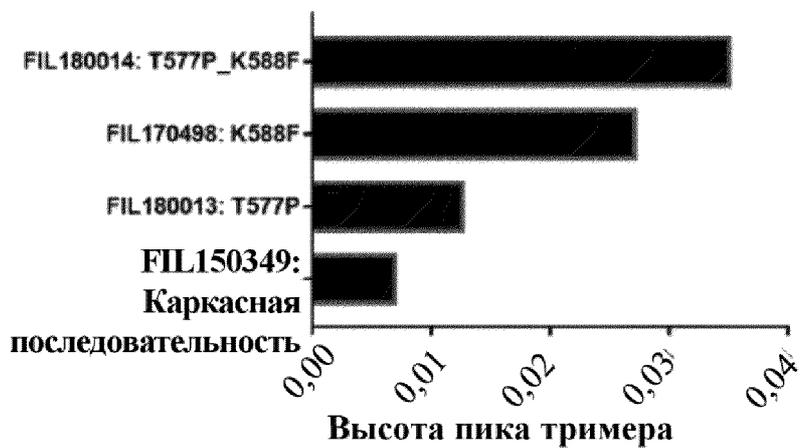
B

GP без муцина из штамма Макона



C

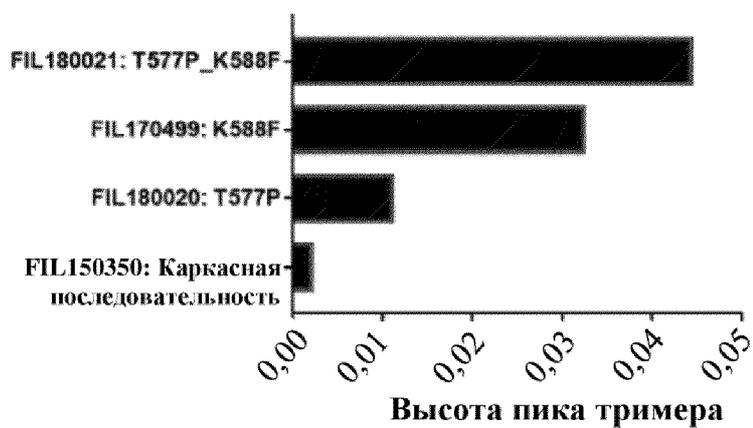
GP из штамма Киквит



ФИГ. 4

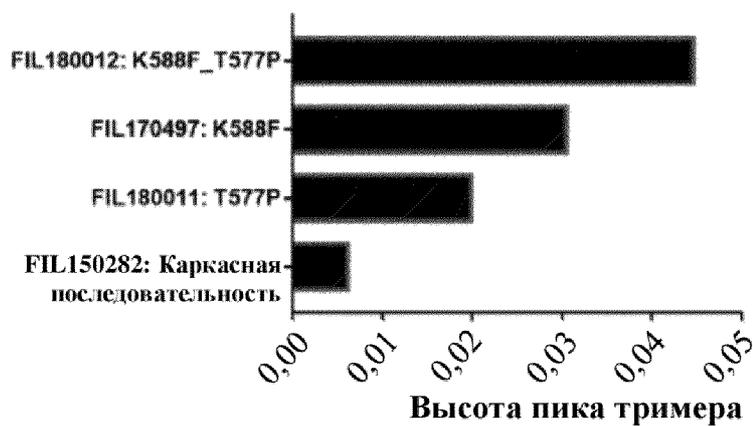
D

GP без муцина из штамма Киквит



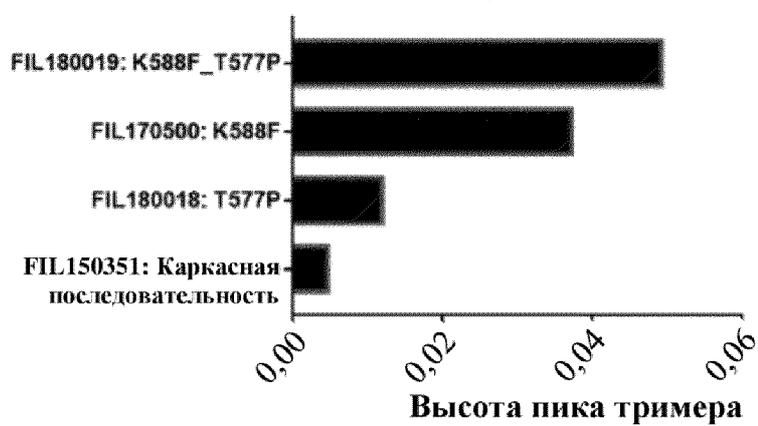
E

GP из штамма Маинга



F

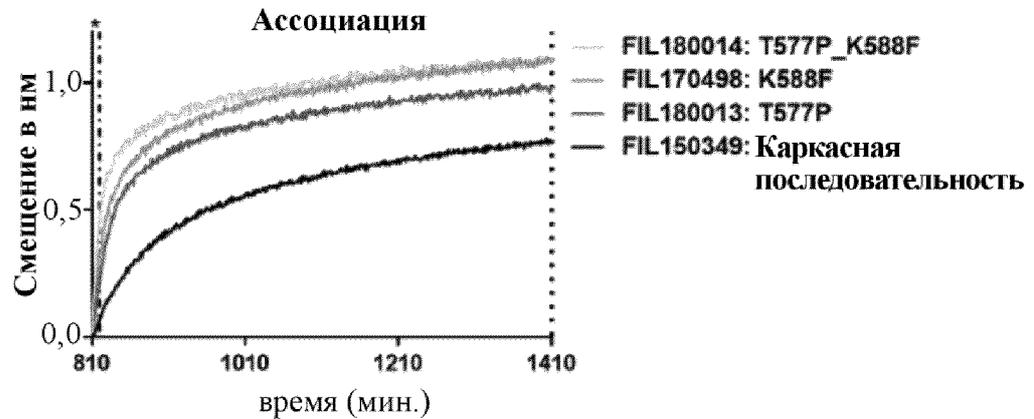
GP без муцина из штамма Маинга



ФИГ. 4 - продолжение

A

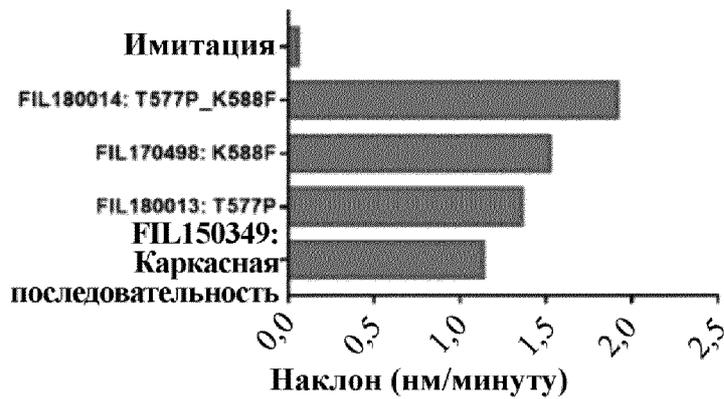
GP из штамма Киквит



*: Угол наклона определяли на промежутке времени от 810 до 820 секунд

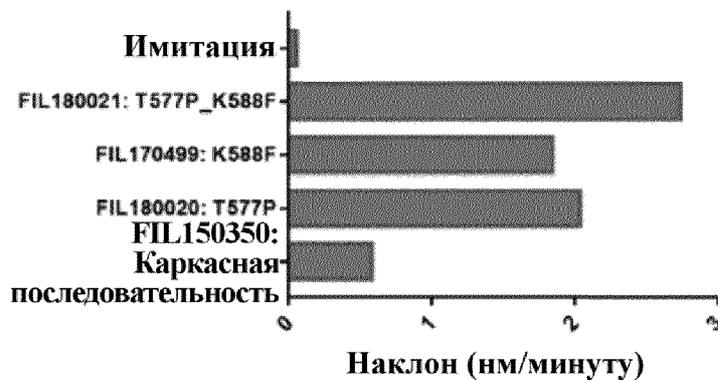
B

GP из штамма Макона



C

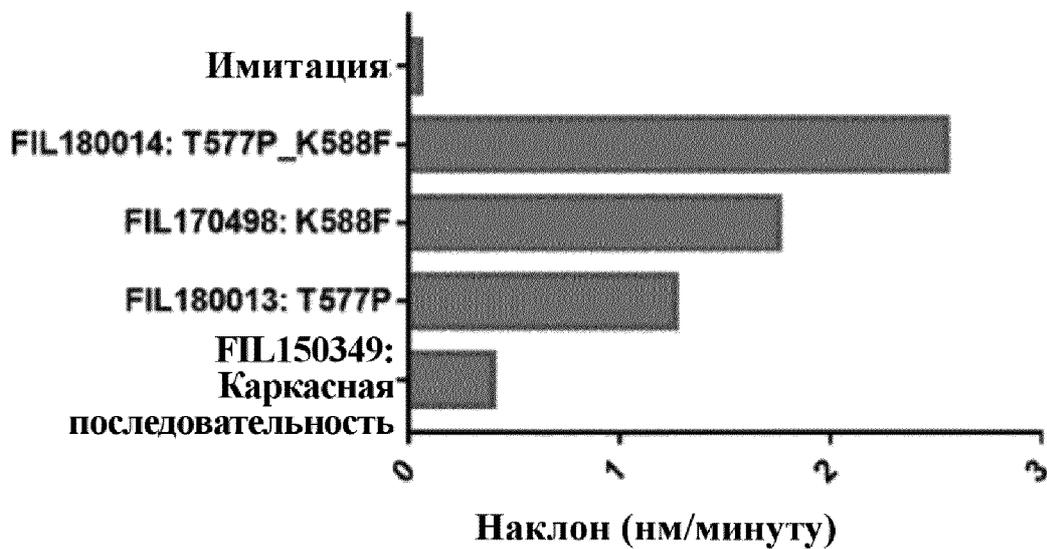
GP без муцина из штамма Макона



ФИГ. 5

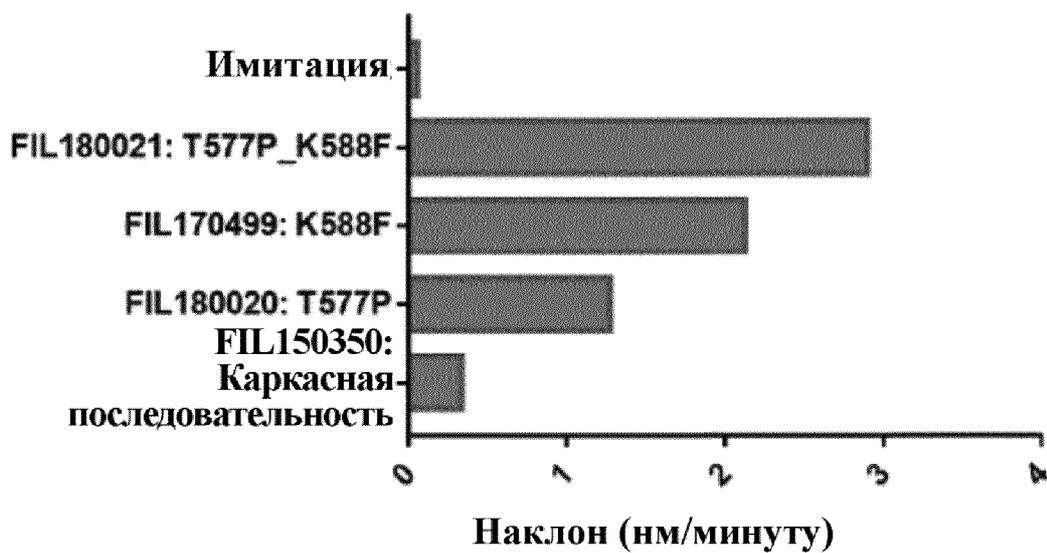
D

GP из штамма Киквит



E

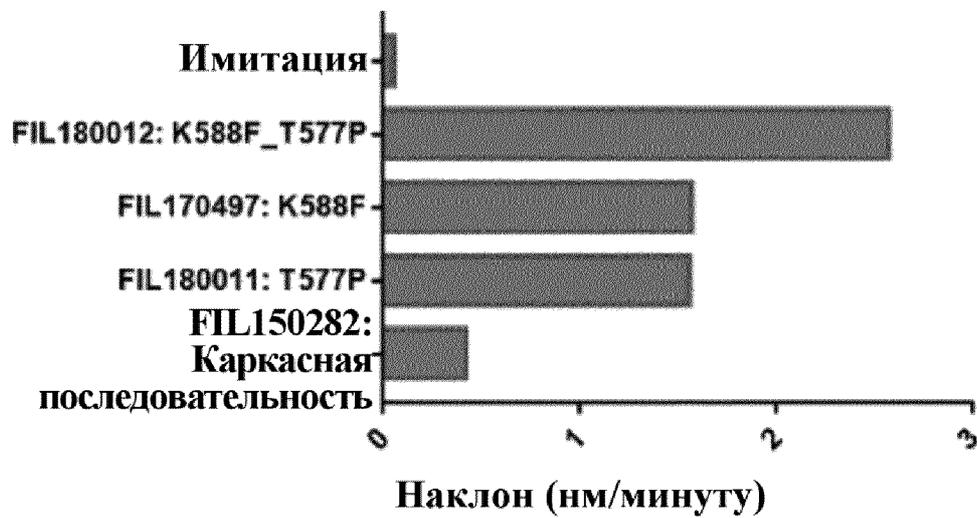
GP без муцина из штамма Киквит



ФИГ. 5 - продолжение

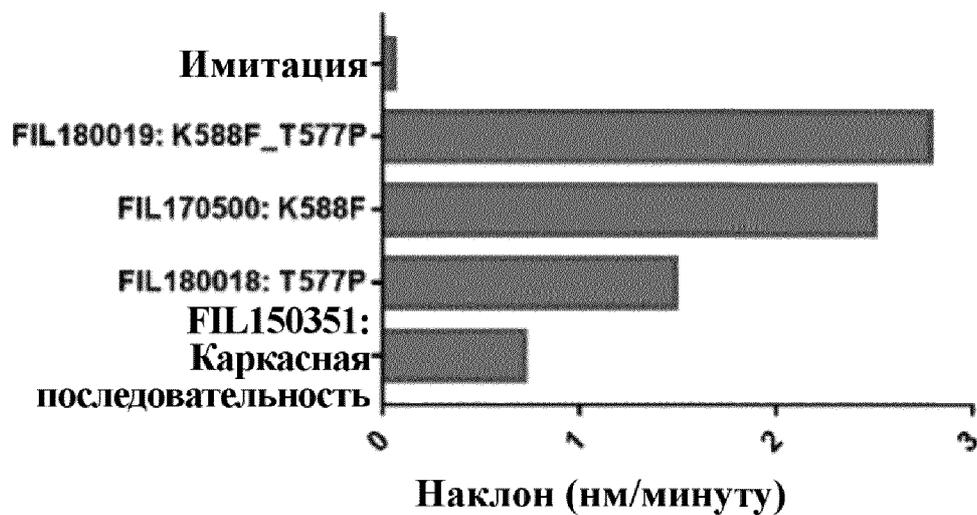
F

GP из штамма Маинга



G

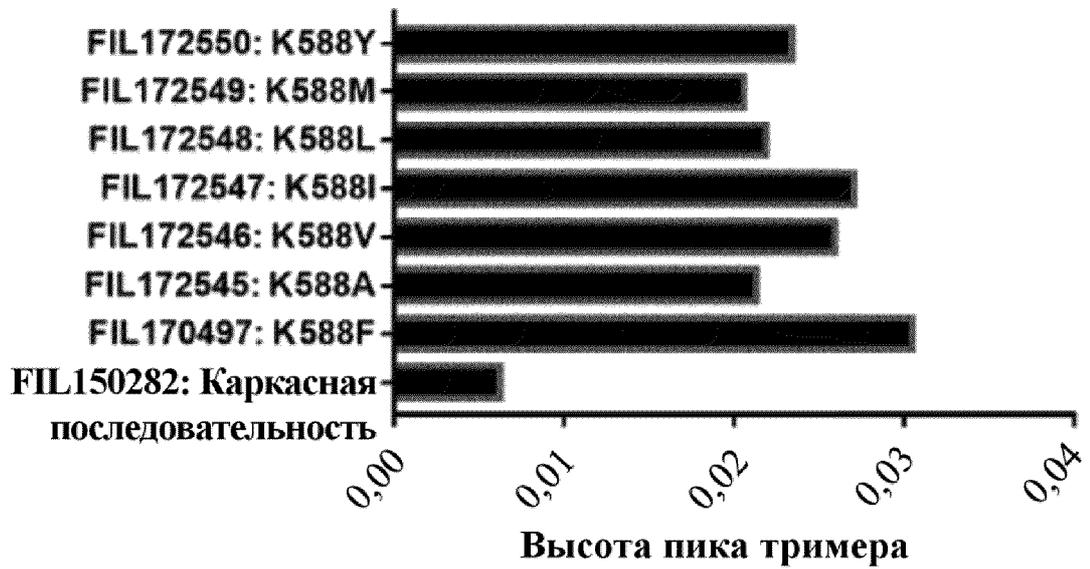
GP без муцина из штамма Маинга



ФИГ. 5 - продолжение

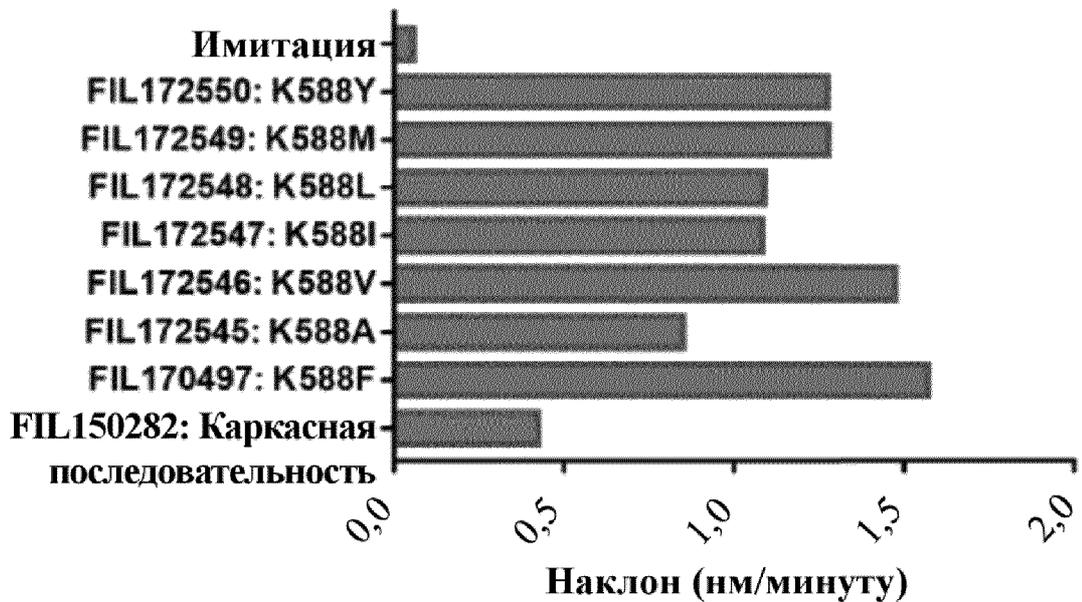
A

GP из штамма Маинга



B

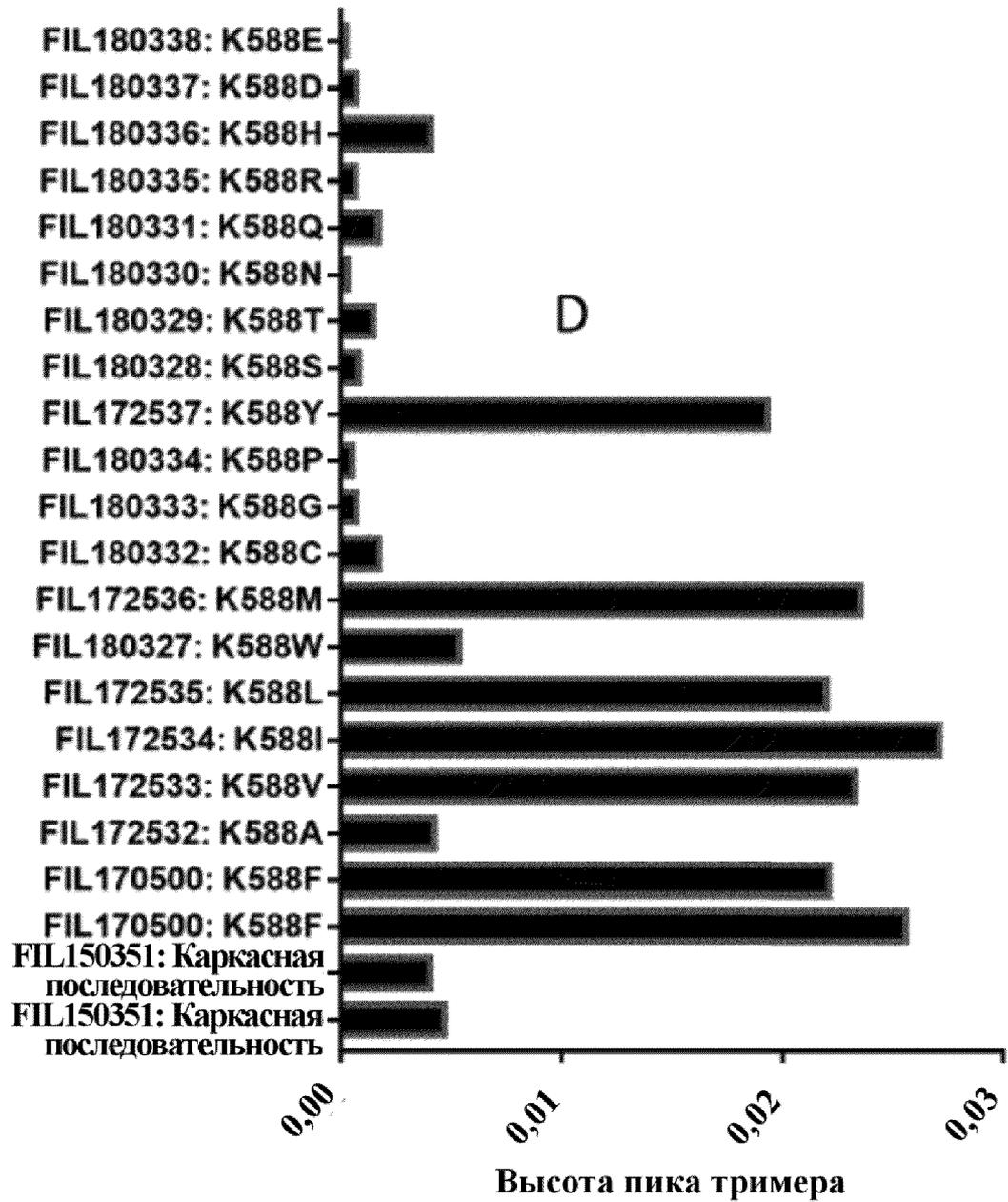
GP из штамма Маинга



ФИГ. 6

С

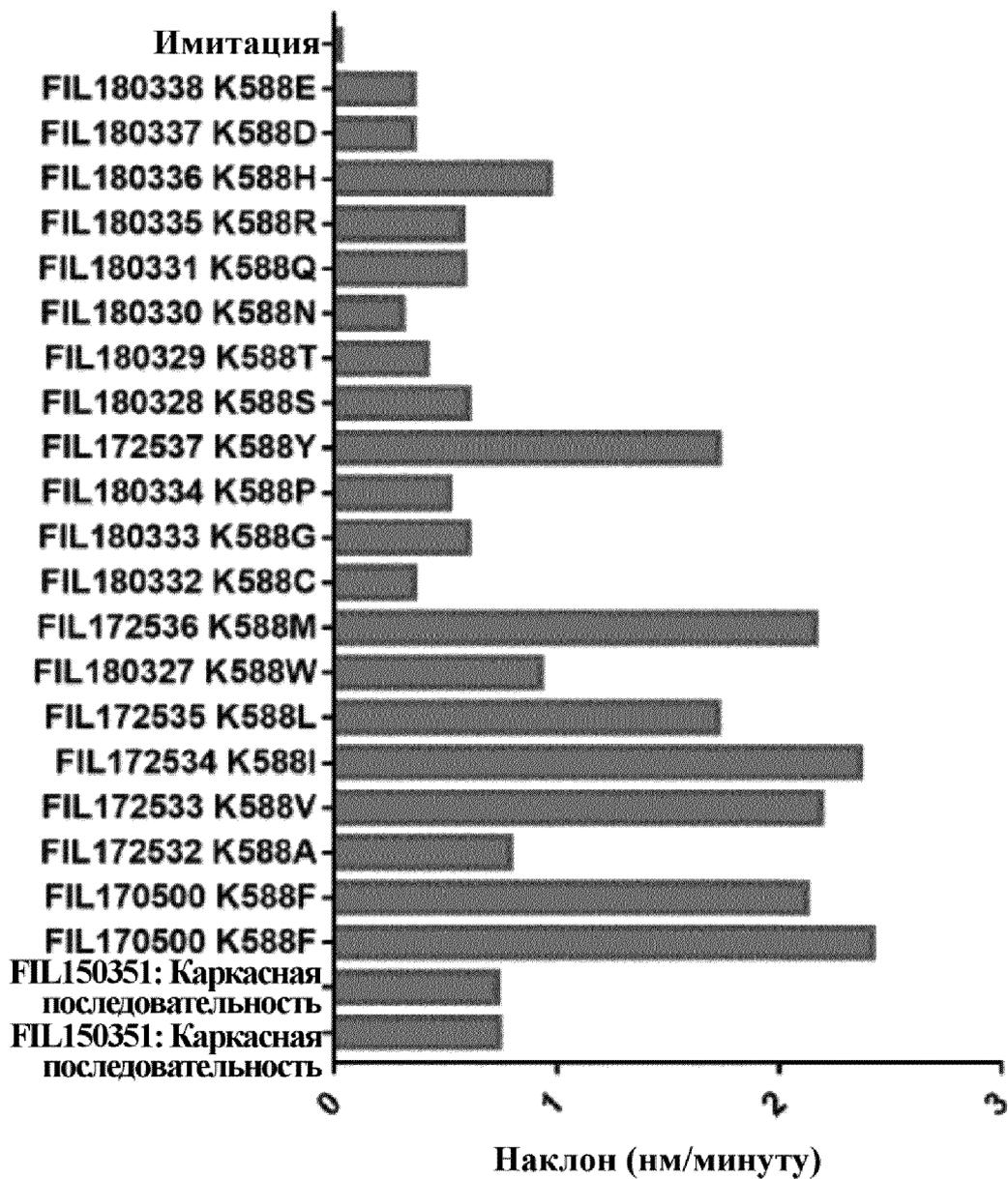
GP без муцина из штамма Маинга



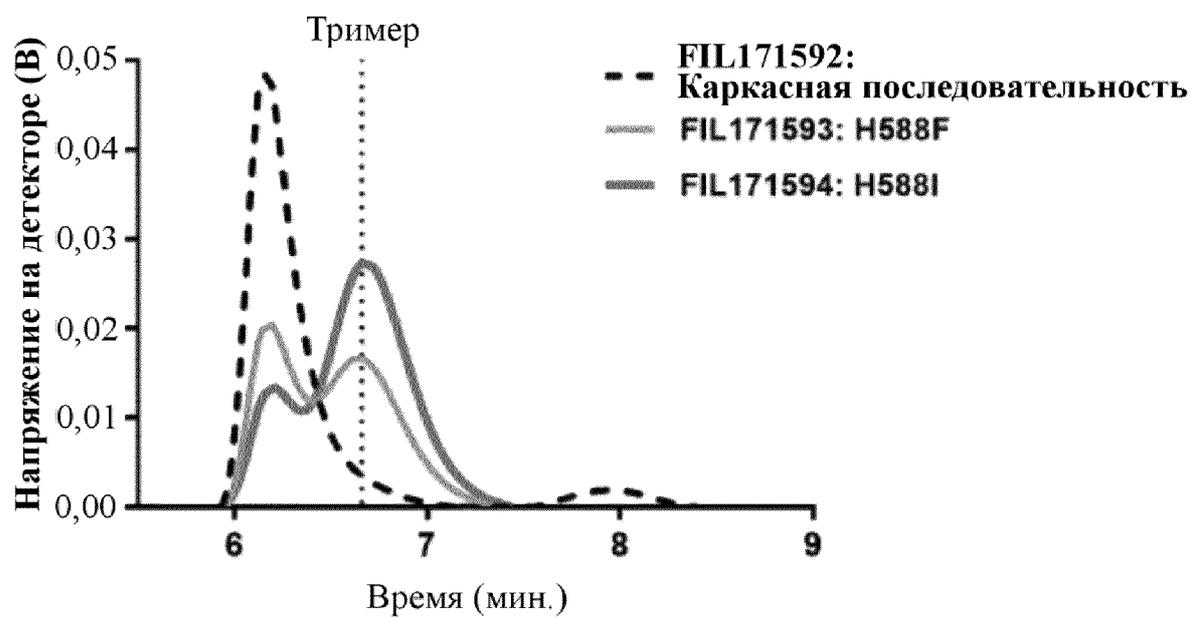
ФИГ. 6 - продолжение

D

GP без муцина из штамма Маинга



ФИГ. 6 - продолжение

GP без муцина вируса Марбург**ФИГ. 7**