

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202191355 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.09.20

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)  
*C07K 14/005* (2006.01)  
*A61P 31/14* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.11.12

(54) СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ F-БЕЛКИ RSV ДО СЛИЯНИЯ

(31) 18205863.6

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

(32) 2018.11.13

(33) EP

(86) PCT/EP2019/080989

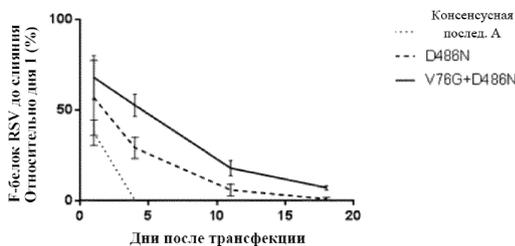
(87) WO 2020/099383 2020.05.22

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

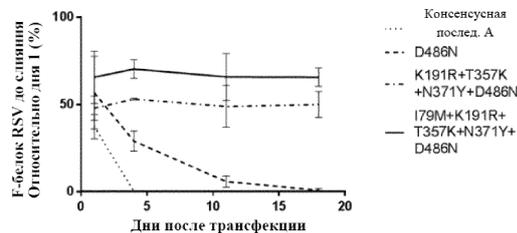
(71) Заявитель:  
ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД  
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)

(57) Изобретение относится к стабильным F-белкам респираторно-синцициального вируса (RSV) до слияния, к иммуногенным композициям, содержащим указанные белки, и к их применениям для профилактики и/или лечения инфекции, вызванной RSV.

Стабилизирующий эффект V76G



Стабилизирующий эффект I79M



A1

202191355

202191355

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568475EA/019

### СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ F-БЕЛКИ RSV ДО СЛИЯНИЯ

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

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

После открытия респираторно-синцитиального вируса (RSV) в 1950-ых годах этот вирус быстро стал признанным патогеном, ассоциированным с инфекциями нижних и верхних дыхательных путей у людей. По оценкам в мире ежегодно наблюдается 64 миллионов случаев инфекции RSV, которые приводят к 160000 смертельных исходов (WHO Acute Respiratory Infections Update September 2009). Наиболее тяжело заболевание протекает, в частности, у недоношенных детей, пожилых индивидуумов и индивидуумов с ослабленным иммунитетом. У детей младше 2 лет RSV является наиболее распространенным патогеном дыхательных путей, который является причиной примерно 50% случаев госпитализации вследствие респираторных инфекций, и пик госпитализации наблюдается в возрасте 2-4-месяцев. Сообщалось, что практически все дети к двухлетнему возрасту были инфицированы RSV. Повторные инфекции в течение жизни связаны с малоэффективным врожденным иммунитетом. У пожилых людей бремя заболевания, вызванного RSV, является сходным с таковым, которое вызвано инфекциями, возбудителем которых является непандемический вирус гриппа А.

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

F-белок RSV обеспечивает слияние мембран вируса и клетки-хозяина путем необратимого рефолдинга белка из лабильной конформации до слияния в стабильную конформацию после слияния. Структуры обеих конформаций были определены для F-белка RSV (McLellan JS, et al. (2010, 2013, 2013); Swanson KA, et al. (2011)), а также для белков слияния из родственных парамиксовирусов, что дает представление о сложном механизме этого белка слияния. Подобно другим белкам слияния I класса, для неактивного предшественника, F<sub>0</sub> RSV, требуется расщепление с помощью фуриноподобной протеазы в ходе внутриклеточного созревания. F-белок RSV содержит два сайта расщепления для фурина, что приводит к образованию трех полипептидов: F2, p27 и F1, причем последний на своем N-конце содержит гидрофобный пептид слияния (FP). Для рефолдинга из конформации до слияния в конформацию после слияния участок рефолдинга 1 (RR1), находящийся между остатками 137 и 216, который включает FP и

гептадный повтор А (HRA), подлежит трансформации из сборки в виде спиралей, петель и нитей в длинную непрерывную спираль. FP, расположенный на N-концевом сегменте RR1, в дальнейшем способен вытягиваться от вирусной мембраны и встраиваться в проксимальный участок мембраны целевой клетки. Затем участок рефолдинга 2 (RR2), который образует С-концевую петлю в шиповидном отростке F-белка до слияния и включает гептадный повтор В (HRB), перемещается на другую сторону головки F-белка RSV и связывает суперспиральный тример HRA с доменом HRB с образованием пучка из шести спиралей. Образование суперспиральной структуры RR1 и перемещение RR2 с образованием пучка из шести спиралей представляют собой наиболее важные структурные изменения, которые происходят в ходе процесса рефолдинга.

В настоящее время вакцина против инфекции, вызванной RSV, все еще отсутствует, но является крайне необходимой из-за высокого бремени заболевания. Гликопротеин слияния RSV (F-белок RSV) представляет собой перспективный антиген для получения вакцины, поскольку он является главной мишенью для нейтрализующих антител в сыворотке крови человека. Большинство нейтрализующих антител в сыворотке крови человека направлены против конформации до слияния, однако из-за ее нестабильности конформация до слияния характеризуется склонностью к преждевременному рефолдингу в конформацию после слияния как в жидкой среде, так и на поверхности вирионов. Как указывалось выше, с помощью кристаллических структур обнаружили значительное конформационное изменение между состояниями до слияния и после слияния. Величина перестройки предполагала, что только часть антител, направленных на конформацию RSV-F после слияния, будет способна к перекрестной реакции с нативной конформацией шиповидного отростка до слияния на поверхности вируса. Соответственно, усилия по созданию вакцины против RSV сосредоточивались на разработке вакцин, которые содержат формы F-белка RSV до слияния (см., например, WO20101149745, WO2010/1149743, WO2009/1079796, WO2012/158613), но на сегодняшний день такая вакцина все еще не создана.

Следовательно, сохраняется потребность в эффективных вакцинах против RSV, в частности в вакцинах, содержащих F-белки RSV в конформации до слияния. Целью настоящего изобретения является обеспечение средств для получения таких стабильных F-белков RSV до слияния для применения в вакцинации против RSV.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к стабильным рекомбинантным белки слияния (F) респираторно-синцитиального вируса (RSV) до слияния, т. е., рекомбинантным F-белкам RSV, которые являются стабилизированными в конформации до слияния, и их фрагменты. F-белки RSV до слияния или их фрагменты содержат по меньшей мере один эпитоп, который является специфическим в отношении F-белка с конформацией до слияния, например, как определено посредством специфического связывания антитела, которое является специфическим для конформации до слияния, с белками. В некоторых вариантах осуществления F-белки RSV до слияния представляют собой растворимые

мультимерные, например тримерные, белки. Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим F-белки RSV до слияния или их фрагменты, а также к векторам, например аденовирусным векторам, содержащим такие молекулы нуклеиновой кислоты.

Настоящее изобретение также относится к способам стабилизации F-белков RSV в конформации до слияния и к F-белкам RSV до слияния, получаемым с помощью указанных способов.

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

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

ФИГ 1: показана консенсусная аминокислотная последовательность эктодомена F-белка RSV подгруппы А RSV, который был использован для конструирования описанных в примерах мутантных вариантов F-белка RSV подгруппы А. Полипептид-предшественник содержит С-концевое удлинение с линкером и доменом тримеризации фолдона (подчеркнут). Консенсусная последовательность F-белка RSV очень похожа на последовательность F-белка RSV дикого типа (не подвергавшегося пассированию) группы А (Kumaria et al. (2011)).

ФИГ 2: показана консенсусная аминокислотная последовательность эктодомена F-белка RSV подгруппы В, который был использован для конструирования описанных в примерах мутантных вариантов F-белка RSV подгруппы В. Полипептид-предшественник содержит С-концевое удлинение с линкером и доменом тримеризации фолдона (подчеркнут). Консенсусная последовательность F-белка RSV очень похожа на последовательность F-белка RSV дикого типа (не подвергавшегося пассированию) (Kumaria et al. (2011)).

ФИГ. 3: стабильность F-белка до слияния, имеющего консенсусную последовательность F-белка подтипа А, и его вариантов. Содержание F-белка в конформации до слияния измеряли в супернатанте трансфицированных клеток так, как описано в примере 1. Супернатанты трансфицированных клеток собирали, хранили при 4°C и тестировали на содержание F-белка до слияния через 1, 4, 11 и 18 дней хранения. На кривых распада видно, что мутации I79M, P101S, P101Q, P101T, I152V или Q354L стабилизируют F-белок до слияния по сравнению с ранее описанным стабилизированным F-белком подтипа А, содержащим единственную мутацию D486N (как описано в WO2017/005844).

ФИГ. 4: стабильность F-белка до слияния, имеющего консенсусную последовательность F-белка подтипа В, и его вариантов. Содержание F-белка в конформации до слияния измеряли в супернатанте трансфицированных клеток так, как описано в примере 1. Супернатанты трансфицированных клеток собирали, хранили при 4 градусах и тестировали на содержание F-белка до слияния через 1, 4, 11 и 18 дней хранения. На кривых распада видно, что мутации T152M и K226M стабилизируют F-белок до слияния по сравнению с F-D486N подтипа В (как описано в WO2017/005844).

ФИГ. 5: очистка F-белка RSV до слияния (RSV180305; SEQ ID NO: 20). Данный вариант содержит замену D486N и две дополнительные замены в соответствии с настоящим изобретением, которые дополнительно стабилизируют конформацию до слияния (P101Q и I152V) и облегчают очистку F-белка RSV до слияния (RSV172527; SEQ ID NO: 21), стабилизированного в конформации до слияния с помощью мутаций S46G, L203I, S215P, T357R, N371Y, D486N и D489Y и содержащего дополнительные мутации P101Q и I152V в соответствии с настоящим изобретением. (А) и (В): RSV180305 содержит С-концевую С-метку и был очищен из 300 мл клеток Нек293F, как описано в примере 2. Стрелками показаны объединенные фракции (см. фиг. 5В). Очищенные RSV180305 (С) и RSV172527 (D) были проанализированы с помощью SEC-MALS после хранения при 4°C в течение 4 недель.

ФИГ. 6: результаты SDS-PAGE-анализа RSV172527 (SEQ ID NO: 21), образец белка, содержащий объединенный пик из SEC-хроматограммы в невозстанавливающих (полоса 2) и восстанавливающих (полоса 4) условиях. Гель окрашен кумасси бриллиантовым синим.

ФИГ. 7: результаты ELISA очищенных F-белков RSV180305 (SEQ ID NO: 20) и RSV172527 (SEQ ID NO: 21) до слияния сравнивали с контрольным F-белком RSV150042 (SEQ ID NO: 22) (например, PRPM, который описан в WO2017/174568) до слияния, и их тестировали на связывание с моноклональными антителами CR9501 и CR9502, которые являются специфическими к конформации до слияния F-белка RSV (которые содержат переменные области антител 58C5 и 30D8, как описано в WO2012/006596, соответственно), и Mab CR9506, которое связывается с F-белком RSV в конформации как до, так и после слияния, и содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 25, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 26.

Данные на графике представлены в виде средних значений  $\pm$  SE.

**ФИГ. 8:** термостабильность очищенных F-белков (A) RSV180305 и (B) RSV172527 до слияния. Температура плавления ( $T_m$ , °C), определенная с помощью анализа посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) с применением флуоресцентного красителя SyproOrange (как описано в примере 5).

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Белок слияния (F-белок) респираторного синцитиального вируса (RSV) участвует в слиянии мембраны вируса с мембраной клетки-хозяина, которое требуется для инфицирования. МРНК F-белка RSV транслируется в белок-предшественник из 574 аминокислот, обозначаемый F0, который содержит последовательность сигнального пептида на N-конце (например, аминокислотные остатки 1-26 из SEQ ID NO: 13 или 14), которая удаляется сигнальной пептидазой в эндоплазматическом ретикулуме. F0 расщепляется клеточными протеазами (в частности, фурином или фуриноподобными протеазами) по двум сайтам (между аминокислотными остатками 109/110 и 136/137) с удалением короткой гликозилированной последовательности, расположенной посередине (также называемой участком p27, содержащим аминокислотные остатки 110-136) и образованием двух доменов (или субъединиц), обозначаемых F1 и F2. Домен F1 (аминокислотные остатки 137-574) содержит гидрофобный пептид слияния на своем N-конце, и C-конец содержит трансмембранный (TM) (аминокислотные остатки 530-550) и цитоплазматический участок (аминокислотные остатки 551-574). Домен F2 (аминокислотные остатки 27-109) ковалентно связан с F1 двумя дисульфидными мостиками. Гетеродимеры F1-F2 подвергаются сборке в вирионе в виде гомотримеров.

Как описано выше, вакцина против инфекции, вызванной RSV, в настоящее время еще отсутствует. Одним потенциальным подходом к получению вакцины является получение субъединичной вакцины на основе очищенного F-белка RSV. Однако для данного подхода необходимо, чтобы очищенный F-белок RSV имел конформацию, которая напоминает конформацию состояния до слияния у F-белка RSV, и была стабильной с течением времени, т. е. чтобы он оставался в конформации до слияния, например, как определено посредством специфического связывания F-белка RSV с антителами, которые являются специфическими в отношении F-белка RSV в конформации до слияния и могут быть получены в достаточных количествах. Кроме того, для белковой вакцины на основе растворимой субъединицы необходимо осуществить усечение F-белка RSV путем делеции трансмембранного (TM) и цитоплазматического участка с получением растворимого секретлируемого F-белка (sF-белка). Поскольку TM-участок отвечает за заякоривание в мембране и увеличивает стабильность, неспособный к заякориванию растворимый F-белок является в значительной степени более лабильным, чем полноразмерный белок, и будет с еще большей легкостью подвергаться рефолдингу в конечное состояние после слияния. Для получения растворимого F-белка в стабильной конформации до слияния, который характеризуется высокими уровнями экспрессии и высокой стабильностью, необходимо, таким образом, стабилизировать конформацию до

слияния. Поскольку полноразмерный (мембраносвязанный) F-белок RSV также является метастабильным, для полноразмерного F-белка RSV, т. е. включающего TM- и цитоплазмический участок, также необходима стабилизация конформации до слияния, например в случае любого подхода по созданию живых аттенуированных вакцин или векторных вакцин.

Для стабилизации растворимого F-белка RSV, который в конформации до слияния расщепляется на субъединицы F1 и F2, производили слияние фибритинового домена тримеризации с С-концом растворимого F-белка RSV (McLellan et al., (2010, 2013)). Этот домен фибритина или "фолдон" получают из T4-фибритина и ранее он был описан как искусственный домен, обуславливающий природную тримеризацию (Letarov et al., (1993); S-Guthe et al., (2004)). Однако слияние этого домена тримеризации не позволяет получить стабильный F-белок RSV до слияния (Kragup et al., (2015)). Действительно, эти усилия даже не позволили получить кандидатов, пригодных для тестирования у людей.

Недавно авторами настоящего изобретения были описаны комбинации из нескольких мутаций, которые стабилизируют F-белок RSV в конформации до слияния (например, WO2014/174018 и WO2014/202570). Так, были описаны стабильные F-белки RSV до слияния, содержащие, например, мутацию аминокислотного остатка в положении 215, предпочтительно мутацию по типу замены аминокислотного остатка S в положении 215 на P. Кроме того, были описаны растворимые F-белки RSV до слияния, содержащие усеченный домен F1 и содержащие мутацию аминокислотного остатка в положении 215, предпочтительно мутацию по типу замены аминокислотного остатка S в положении 215 на P, при этом белок содержит гетерологичный домен тримеризации, связанный с указанным усеченным доменом F1. Были описаны дополнительные F-белки RSV до слияния, при этом белки содержат одну или более других стабилизирующих мутаций, таких как мутация по типу замены аминокислотного остатка D в положении 486 на N, мутация по типу замены аминокислотного остатка L в положении 203 на I, мутация по типу замены аминокислотного остатка T в положении 357 на K или R и/или мутация по типу замены аминокислотного остатка N в положении 371 на Y, необязательно в комбинации с мутацией в положении 215. Были описаны дополнительные F-белки RSV до слияния, при этом белки содержат еще одну или более других мутаций, таких как мутация по типу замены аминокислотного остатка D в положении 489 на Y, мутация по типу замены аминокислотного остатка S в положении 398 на L и/или мутация по типу замены аминокислоты K в положении 394 на R.

Настоящее изобретение предусматривает новые рекомбинантные белки слияния (F-белок) респираторно-синцитиального вируса (RSV) до слияния, содержащие одну или более стабилизирующих аминокислот, где одна или более стабилизирующих аминокислот присутствуют в положениях 79, 101, 152, 226 и/или в положении 354, необязательно в комбинации со стабилизирующей аминокислотой в положении 486. В соответствии с настоящим изобретением было обнаружено, что присутствие одной или нескольких конкретных стабилизирующих аминокислот в положениях 79, 101, 152, 354 и/или 226

(нумерация согласно SEQ ID NO 13 или 14), необязательно в комбинации с присутствием аминокислотного остатка N в положении 486, обуславливает стабилизацию белка в конформации до слияния.

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением было продемонстрировано, что присутствие конкретных стабилизирующих аминокислот в указанных положениях обуславливает увеличенную стабильность белков в конформации до слияния. В соответствии с настоящим изобретением конкретные аминокислоты могут либо уже присутствовать в аминокислотной последовательности, либо могут быть внесены путем замены (мутации) аминокислоты в этом положении на конкретную аминокислоту в соответствии с настоящим изобретением.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает рекомбинантные F-белки, содержащие аминокислотную последовательность F-белка RSV, где аминокислота в положении 79 представляет собой M, аминокислота в положении 101 представляет собой S, Q или T, аминокислота в положении 152 представляет собой V или M, аминокислота в положении 226 представляет собой M, и/или аминокислота в положении 354 представляет собой L, и где, необязательно, аминокислота в положении 486 представляет собой N.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает рекомбинантные F-белки RSV подгруппы A, содержащие аминокислотную последовательность F-белка RSV, где аминокислота в положении 79 представляет собой M, аминокислота в положении 101 представляет собой S, Q или T, аминокислота в положении 152 представляет собой V или M, и/или аминокислота в положении 354 представляет собой L, и где, необязательно, аминокислота в положении 486 представляет собой N.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает рекомбинантные F-белки RSV подгруппы B, содержащие аминокислотную последовательность F-белка RSV, где аминокислота в положении 152 представляет собой V или M, и/или аминокислота в положении 226 представляет собой M, и где, необязательно, аминокислота в положении 486 представляет собой N.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает рекомбинантные F-белки до слияния, содержащие одну или более стабилизирующих мутаций, выбранных из группы, состоящей из мутации аминокислотного остатка в положении 79, мутации аминокислотного остатка в положении 101, мутации аминокислотного остатка в положении 152, мутации аминокислотного остатка в положении 226 и мутации аминокислотного остатка в положении 354, необязательно в комбинации с мутацией аминокислоты в положении 486.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает рекомбинантные F-белки до слияния, содержащие мутацию аминокислотного остатка в положении 486, предпочтительно мутацию по типу замены аминокислоты D в положении 486 на N (D486N), в комбинации с одной или несколькими стабилизирующими

мутациями, выбранными из группы, состоящей из мутации аминокислотного остатка в положении 79, мутации аминокислотного остатка в положении 101, мутации аминокислотного остатка в положении 152, мутации аминокислотного остатка в положении 354 и мутации аминокислотного остатка в положении 226.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает рекомбинантные F-белки RSV подгруппы А до слияния, содержащие одну или более стабилизирующих мутаций, выбранных из группы, состоящей из мутации аминокислотного остатка в положении 79, мутации аминокислотного остатка в положении 101, мутации аминокислотного остатка в положении 152 и мутации аминокислотного остатка в положении 354, необязательно в комбинации с мутацией аминокислотного остатка в положении 486, предпочтительно мутацией по типу замены аминокислоты D в положении 486 на N (D486N).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает рекомбинантные F-белки RSV подгруппы В до слияния, содержащие мутацию аминокислотного остатка в положении 152 и/или мутацию аминокислотного остатка в положении 226, необязательно в комбинации с мутацией аминокислотного остатка в положении 486, предпочтительно мутацией по типу замены аминокислоты D в положении 486 на N (D486N).

В некоторых вариантах осуществления мутация аминокислотного остатка в положении 79 представляет собой мутацию по типу замены аминокислоты изолейцин (I) на метионин (M) (I79M).

В некоторых вариантах осуществления мутация аминокислотного остатка в положении 101 представляет собой мутацию по типу замены аминокислоты пролин (P) на серин (S), глутамин (Q) или треонин (T) (P101S, P101Q или P101T).

В некоторых вариантах осуществления мутация аминокислотного остатка в положении 152 представляет собой мутацию по типу замены аминокислоты изолейцин (I) на валин (V) или метионин (M) (I152V или I152M).

В некоторых вариантах осуществления мутация аминокислотного остатка в положении 354 представляет собой мутацию по типу замены аминокислоты глутамин (Q) на лейцин (L) (Q354L).

В некоторых вариантах осуществления мутация аминокислотного остатка в положении 226 представляет собой мутацию по типу замены аминокислоты лизин (K) на метионин (M) (K226M).

В некоторых вариантах осуществления F-белки до слияния содержат одну или более дополнительных стабилизирующих мутаций, выбранных из группы, состоящей из:

- (a) мутации по типу замены аминокислотного остатка S в положении 46 на G;
- (b) мутации по типу замены аминокислотного остатка L в положении 203 на I;
- (c) мутации по типу замены аминокислотного остатка S в положении 215 на P;
- (d) мутации по типу замены аминокислоты T в положении 357 на K;
- (e) мутации по типу замены аминокислоты N в положении 371 на Y;

(f) мутации по типу замены аминокислотного остатка E в положении 487 на Q, N или I; и

(g) мутации по типу замены аминокислотного остатка D в положении 489 на Y; и

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные F-белки до слияния содержат две или более стабилизирующих аминокислот. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные F-белки до слияния содержат две или более стабилизирующих мутаций.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные F-белки до слияния содержат три или более стабилизирующих аминокислот. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные F-белки до слияния содержат три или более стабилизирующих мутаций.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные F-белки до слияния содержат четыре или более стабилизирующих аминокислот или мутаций.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные F-белки до слияния содержат пять или более стабилизирующих аминокислот или мутаций.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные F-белки до слияния содержат шесть или более стабилизирующих аминокислот или мутаций.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные F-белки до слияния содержат семь или более стабилизирующих аминокислот или мутаций.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные F-белки до слияния содержат восемь или более стабилизирующих аминокислот или мутаций.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные F-белки до слияния содержат девять или более стабилизирующих аминокислот или мутаций.

В предпочтительном варианте осуществления рекомбинантный F-белок до слияния происходит из RSV подгруппы A и содержит по меньшей мере мутацию по типу замены аминокислоты P в положении 101 на Q и мутацию по типу замены аминокислоты I в положении 152 на V, необязательно в комбинации с мутацией по типу замены аминокислотного остатка S в положении 46 на G, мутацией по типу замены аминокислотного остатка L в положении 203 на I, мутацией по типу замены аминокислотного остатка S в положении 215 на P, мутацией по типу замены аминокислотного остатка T в положении 357 на R, мутацией по типу замены аминокислотного остатка N в положении 371 на Y, мутацией по типу замены аминокислотного остатка D в положении 486 на N и мутацией по типу замены аминокислотного остатка D в положении 489 на Y.

В предпочтительном варианте осуществления рекомбинантный F-белок до слияния происходит из RSV подгруппы B и содержит по меньшей мере мутацию по типу замены аминокислоты I в положении 152 на M и мутацию по типу замены аминокислоты K в положении 226 на M, необязательно в комбинации с мутацией по типу замены аминокислотного остатка S в положении 46 на G, мутацией по типу замены аминокислотного остатка L в положении 203 на I, мутацией по типу замены

аминокислотного остатка S в положении 215 на R, мутацией по типу замены аминокислотного остатка T в положении 357 на R, мутацией по типу замены аминокислотного остатка N в положении 371 на Y, мутацией по типу замены аминокислотного остатка D в положении 486 на N и мутацией по типу замены аминокислотного остатка D в положении 489 на Y.

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

В некоторых вариантах осуществления F-белки RSV до слияния по настоящему изобретению или их фрагменты содержат по меньшей мере один эпитоп, который распознается моноклональным антителом, специфичным к конформации до слияния, содержащим CDR1-участок тяжелой цепи под SEQ ID NO: 1, CDR2-участок тяжелой цепи под SEQ ID NO: 2, CDR3-участок тяжелой цепи под SEQ ID NO: 3 и CDR1-участок легкой цепи под SEQ ID NO: 4, CDR2-участок легкой цепи под SEQ ID NO: 5 и CDR3-участок легкой цепи под SEQ ID NO: 6 (далее в этом документе упоминаемый как CR9501), и/или моноклональным антителом, специфичным к конформации до слияния, содержащим CDR1-участок тяжелой цепи под SEQ ID NO: 7, CDR2-участок тяжелой цепи под SEQ ID NO: 8, CDR3-участок тяжелой цепи под SEQ ID NO: 9 и CDR1-участок легкой цепи под SEQ ID NO: 10, CDR2-участок легкой цепи под SEQ ID NO: 11 и CDR3-участок легкой цепи под SEQ ID NO: 12 (упоминаемый как CR9502) (таблица 2). CR9501 и CR9502 содержат переменные участки тяжелой и легкой цепей, и, таким образом, обладают связывающими специфичностями, антител 58C5 и 30D8 соответственно, которые, как было показано ранее, специфично связываются с F-белком RSV в его конформации до слияния, но не в конформации после слияния (см. WO2012/006596).

Настоящее изобретение также предусматривает способы стабилизации конформации F-белка RSV до слияния, при этом указанные способы предусматривают введение одной или нескольких стабилизирующих мутаций в F-белок RSV, при этом одна или более стабилизирующих мутаций выбраны из группы, состоящей из:

мутации аминокислотного остатка в положении 79, мутации аминокислотного остатка в положении 101, мутации аминокислотного остатка в положении 152, мутации аминокислотного остатка в положении 354 и мутации аминокислотного остатка в

положении 226, необязательно в комбинации с мутацией аминокислоты в положении 486, предпочтительно мутацией по типу замены аминокислоты D в положении 486 на N (D486N).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы стабилизации F-белка RSV подгруппы А, при этом указанные способы предусматривают введение одной или нескольких стабилизирующих мутаций, выбранных из группы, состоящей из мутации аминокислотного остатка в положении 79, мутации аминокислотного остатка в положении 101 и мутации аминокислотного остатка в положении 354, необязательно в комбинации с мутацией аминокислотного остатка в положении 486, предпочтительно мутацией по типу замены аминокислоты D в положении 486 на N (D486N).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы стабилизации F-белка RSV подгруппы В, при этом указанные способы предусматривают введение мутации аминокислотного остатка в положении 152 и/или мутации аминокислотного остатка в положении 226, необязательно в комбинации с мутацией аминокислотного остатка в положении 486, предпочтительно мутацией по типу замены аминокислоты D в положении 486 на N (D486N).

В некоторых вариантах осуществления мутация аминокислотного остатка в положении 79 представляет собой мутацию по типу замены аминокислоты изолейцин (I) на метионин (M) (I79M).

В некоторых вариантах осуществления мутация аминокислотного остатка в положении 101 представляет собой мутацию по типу замены аминокислоты пролин (P) на серин (S), глутамин (Q) или треонин (T) (P101S, P101Q или P101T).

В некоторых вариантах осуществления мутация аминокислотного остатка в положении 152 представляет собой мутацию по типу замены аминокислоты изолейцин (I) на валин (V) или метионин (M) (I152V или I152M).

В некоторых вариантах осуществления мутация аминокислотного остатка в положении 354 представляет собой мутацию по типу замены аминокислоты глутамин (Q) на лейцин (L) (Q354L).

В некоторых вариантах осуществления мутация аминокислотного остатка в положении 226 представляет собой мутацию по типу замены аминокислоты лизин (K) на метионин (M) (K226M).

В некоторых вариантах осуществления способы предусматривают введение одной или нескольких дополнительных стабилизирующих мутаций, выбранных из группы, состоящей из:

- (a) мутации по типу замены аминокислотного остатка S в положении 46 на G;
- (b) мутации по типу замены аминокислотного остатка L в положении 203 на I;
- (c) мутации по типу замены аминокислотного остатка S в положении 215 на P;
- (d) мутации по типу замены аминокислоты T в положении 357 на K;
- (e) мутации по типу замены аминокислоты N в положении 371 на Y;

(f) мутации по типу замены аминокислотного остатка E в положении 487 на Q, N или I; и

(g) мутации по типу замены аминокислотного остатка D в положении 489 на Y.

В некоторых вариантах осуществления способы предусматривают введение двух или более стабилизирующих мутаций.

В некоторых вариантах осуществления способы предусматривают введение трех или более стабилизирующих мутаций.

В некоторых вариантах осуществления способы предусматривают введение четырех или более стабилизирующих мутаций.

В некоторых вариантах осуществления способы предусматривают введение пяти или более стабилизирующих мутаций.

В некоторых вариантах осуществления способы предусматривают введение шести или более стабилизирующих мутаций.

В некоторых вариантах осуществления способы предусматривают введение семи или более стабилизирующих мутаций.

В некоторых вариантах осуществления способы предусматривают введение восьми или более стабилизирующих мутаций.

В некоторых вариантах осуществления способы предусматривают введение девяти или более стабилизирующих мутаций.

В предпочтительном варианте осуществления F-белок RSV происходит из подгруппы A, а способ предусматривает введение по меньшей мере мутации по типу замены аминокислоты P в положении 101 на Q и мутации по типу замены аминокислоты I в положении 152 на V.

В другом предпочтительном варианте осуществления F-белок RSV происходит из подгруппы B, а способ предусматривает введение по меньшей мере мутации по типу замены аминокислоты T в положении 152 на M и мутации по типу замены аминокислоты K в положении 226 на M.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает рекомбинантные F-белки RSV до слияния, получаемые с помощью указанных способов, а также варианты их применения, которые описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные F-белки RSV до слияния по настоящему изобретению являются тримерными белками.

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

известны специалисту в данной области.

В некоторых вариантах осуществления кодируемые белки или фрагменты в соответствии с настоящим изобретением содержат сигнальную последовательность, также называемую лидерной последовательностью или сигнальным пептидом, соответствующую аминокислотам 1-26 из SEQ ID NO: 13 или 14. Сигнальные последовательности обычно являются короткими (например, 5-30 аминокислот в длину) аминокислотными последовательностями, присутствующими на N-конце большинства вновь синтезированных белков, которые направляются по секреторному пути и обычно отщепляются сигнальной пептидазой с образованием свободного сигнального пептида и зрелого белка.

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

В некоторых вариантах осуществления F-белки RSV до слияния (или их фрагменты) являются растворимыми белками (т. е. не мембраносвязанными). В некоторых вариантах осуществления стабильные F-белки RSV до слияния или их фрагменты в соответствии с настоящим изобретением содержат усеченный домен F1 и содержат гетерологичный домен тримеризации или домен сборки для сборок тримеров более высокого порядка, которые связаны с указанным усеченным доменом F1. В соответствии с настоящим изобретением было показано, что путем связывания гетерологичного домена тримеризации с С-концевым аминокислотным остатком усеченного домена F1, объединенного с одной или несколькими стабилизирующими мутациями, как описано в данном документе, получают растворимые F-белки RSV, которые характеризуются высокой экспрессией и которые связываются с антителами, специфичными к конформации до слияния, что указывает на то, что белки находятся в конформации до слияния.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный домен тримеризации содержит аминокислотную последовательность GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 15).

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

В некоторых вариантах осуществления домен тримеризации связан с аминокислотным остатком 513 домена F1 RSV. В некоторых вариантах осуществления домен тримеризации, следовательно, содержит SEQ ID NO: 15 и связан с аминокислотным остатком 513 домена F1 RSV или непосредственно, или посредством линкера.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии F-белков RSV до слияния по настоящему изобретению повышен по сравнению с таковым у F-белка RSV дикого типа и/или с таковым у F-белка RSV, содержащего мутацию по типу замены аминокислоты D в положении 486 на N (D486N). В некоторых вариантах осуществления содержание белка до слияния (определяемое как фракция F-белка, который связывается со специфическим к конформации до слияния антителом CR9501) через 5-10 дней после сбора белков было значительно выше по сравнению с таковым у F-белка дикого типа без указанных стабилизирующих замен.

F-белки RSV до слияния в соответствии с настоящим изобретением являются стабилизированными в конформации до слияния за счет наличия одной или нескольких стабилизирующих аминокислот (либо уже присутствующих, либо введенных посредством мутаций), т. е. данные белки не подвергаются легкому переходу в конформацию после слияния в ходе обработки белков, такой как, например, очистка, циклы замораживания-оттаивания и/или хранение и т. д.

В некоторых вариантах осуществления F-белки RSV до слияния в соответствии с настоящим изобретением характеризуются повышенной стабильностью при хранении при 4°C по сравнению с F-белком RSV без мутации(мутаций). В некоторых вариантах осуществления белки являются стабильными при хранении при 4°C в течение по меньшей мере 15 дней, предпочтительно по меньшей мере 18 дней, предпочтительно по меньшей мере 30 дней, предпочтительно по меньшей мере 60 дней, предпочтительно по меньшей мере 6 месяцев, даже более предпочтительно по меньшей мере 1 года. "Стабильный при хранении" означает, что белки по-прежнему имеют по меньшей мере один эпитоп, специфичный в отношении антител, специфичных к конформации до слияния (например, CR9501 и/или CR9502), при хранении белка в растворе (например, среде для культивирования) при 4°C в течение по меньшей мере 30 дней. В некоторых вариантах осуществления белки имеют по меньшей мере один эпитоп, специфический для конформации до слияния, в течение по меньшей мере 6 месяцев, предпочтительно в течение по меньшей мере 1 года, при хранении F-белков RSV до слияния при 4°C.

В некоторых вариантах осуществления F-белки RSV до слияния в соответствии с настоящим изобретением характеризуются повышенной термостабильностью, определяемой результатами измерения температуры плавления, как описано в примере 6, по сравнению с F-белками RSV без указанной(указанных) мутации(мутаций).

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

В некоторых вариантах осуществления белки содержат His-метку, strep-метку или c-метку. His-метка или полигистидиновая метка представляют собой аминокислотный мотив в белках, который состоит из по меньшей мере пяти остатков гистидина (H); strep-метка представляет собой аминокислотную последовательность, состоящую из 8 остатков (WSHPQFEK (SEQ ID NO: 23)); c-метка представляет собой аминокислотный мотив,

который состоит из 4 остатков (EPEA; SEQ ID NO: 24). Данные метки часто расположены на N- или C-конце белка, и обычно их используют для целей очистки.

Известно, что RSV существует в виде одного серотипа, характеризующегося двумя подгруппами антигенов: А и В. Аминокислотные последовательности зрелых процессированных F-белков двух групп являются идентичными на приблизительно 93%. Как используется по всей настоящей заявке, положения аминокислот приведены по отношению к консенсусной последовательности F-белка клинических изолятов подгруппы А (SEQ ID NO: 13) или подгруппы В (SEQ ID NO: 14). Используемое в настоящем изобретении выражение "аминокислота в положении "х" F-белка RSV таким образом означает аминокислоту, соответствующую аминокислоте в положении "х" в F-белке RSV с SEQ ID NO: 13 (для подгруппы А) или SEQ ID NO: 14 (для подгруппы В). Необходимо отметить, что в системе нумерации, используемой по всей настоящей заявке, 1 относится к N-концевой аминокислоте незрелого F0-белка (SEQ ID NO: 13 или 14). При применении F-белка другого штамма RSV положения аминокислот F-белка следует нумеровать по отношению к нумерации F-белка с SEQ ID NO: 13 (для подгруппы А) или SEQ ID NO: 14 (для подгруппы В) посредством выравнивания последовательностей другого штамма RSV с F-белком с SEQ ID NO: 13 или 14 со вставкой гэпов при необходимости. Выравнивание последовательностей можно выполнять с помощью способов, хорошо известных в данной области, например, с помощью CLUSTALW, Bioedit или CLC Workbench.

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

Аминокислота в соответствии с настоящим изобретением может быть любой из двадцати природных (или 'стандартных' аминокислот). Стандартные аминокислоты можно разделить на несколько групп, исходя из их свойств. Важными факторами являются заряд, гидрофильность или гидрофобность, размер и функциональные группы. Эти свойства являются важными для структуры белков и белок-белковых взаимодействий. Некоторые аминокислоты обладают специфическими свойствами, как, например, цистеин, который может образовывать ковалентные дисульфидные связи (или дисульфидные мостики) с другими цистеиновыми остатками, пролин, который индуцирует повороты белкового остова, и глицин, который является более гибким, чем другие аминокислоты. В таблице 1 приведены сокращения и свойства стандартных аминокислот.

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

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

В предпочтительных вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие белки в соответствии с настоящим изобретением, являются оптимизированными по кодонам для экспрессии в клетках млекопитающего, предпочтительно клетках человека. Способы оптимизации по кодонам известны и были описаны ранее (например, WO 96/09378). Последовательность считается оптимизированной по кодонам, если по меньшей мере один кодон, не являющийся предпочтительным, по сравнению с последовательностью дикого типа замещен кодоном, который является более предпочтительным. В данном документе кодон, не являющийся предпочтительным, представляет собой кодон, который используется менее часто в организме, чем другой кодон, кодирующий такую же аминокислоту, а кодон, являющийся более предпочтительным, представляет собой кодон, который используется более часто в организме, чем кодон, не являющийся предпочтительным. Частоту использования кодонов для конкретного организма можно найти в таблицах частоты использования кодонов, как, например, на сайте <http://www.kazusa.or.jp/codon>. Предпочтительно более одного кодона, не являющегося предпочтительным, предпочтительно большинство или все кодоны, не являющиеся предпочтительными, замещают кодонами, которые являются более предпочтительными. Предпочтительно в оптимизированной по кодонам последовательности используют кодоны, наиболее часто используемые в организме. Как правило, замещение предпочтительными кодонами приводит к более высокой экспрессии.

Специалисту в данной области будет понятно, что в результате вырожденности генетического кода несколько различных полинуклеотидов и молекул нуклеиновой кислоты могут кодировать один и тот же белок. Также понятно, что специалисты в данной области с помощью стандартных методик могут осуществлять нуклеотидные замены, которые не влияют на последовательность белка, кодируемую молекулами нуклеиновой кислоты, для достижения соответствия использованию кодонов в любом конкретном организме-хозяине, в котором будут экспрессироваться эти белки. Следовательно, если не указано иное, "нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность" включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности, которые кодируют белки, и РНК могут включать интроны или могут не включать их.

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

Настоящее изобретение также предусматривает векторы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, описанную выше. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением является частью вектора. С такими векторами можно легко производить манипуляции с

помощью способов, хорошо известных специалисту в данной области, и их, например, можно сконструировать так, чтобы они были способны к репликации в прокариотических и/или эукариотических клетках. Кроме того, многие векторы можно использовать для трансформации эукариотических клеток, и они будут интегрироваться целиком или частично в геном таких клеток, что приведет в результате к стабильным клеткам-хозяевам, содержащим в их геноме необходимую нуклеиновую кислоту. Применяемый вектор может представлять собой любой вектор, который подходит для клонирования ДНК и который можно применять для обеспечения транскрипции нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. Подходящими векторами в соответствии с настоящим изобретением являются, например, аденовекторы, векторы на основе альфавируса, парамиксовируса, вируса осповакцины, вируса герпеса, ретровирусные векторы и т. д. Специалист в данной области может выбрать подходящие векторы экспрессии и вставить последовательности нуклеиновых кислот по настоящему изобретению функциональным образом.

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

Среды для культивирования клеток доступны от различных поставщиков, и подходящую среду можно обычно выбрать для клетки-хозяина для экспрессии белка,

представляющего интерес, в данном случае F-белков RSV до слияния. Подходящая среда может содержать сыворотку крови или может не содержать ее.

"Гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты" (также называемая в данном документе 'трансгеном') представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая в природе не присутствует в клетке-хозяине. Ее вводят, например, в вектор с помощью стандартных методик молекулярной биологии. Трансген, как правило, функционально связывают с последовательностями, контролирующими экспрессию. Это можно выполнять, например, путем помещения нуклеиновой кислоты, кодирующей трансген(трансгены), под контроль промотора. Можно добавлять дополнительные регуляторные последовательности. Для экспрессии трансгена(трансгенов) можно использовать многие промоторы, и они известны специалисту в данной области, например, они могут включать промоторы вируса, млекопитающего, синтетические промоторы и т. п. Неограничивающим примером подходящего промотора для обеспечения экспрессии в эукариотических клетках является промотор CMV (US 5385839), например предранний промотор CMV, например, содержащий нукл. от -735 до +95 из энхансера/промотора предраннего гена CMV. Сигнал полиаденилирования, например сигнал полиА гена бычьего гормона роста (US 5122458), может располагаться позади трансгена(трансгенов). В качестве альтернативы несколько широко используемых векторов экспрессии можно получить на основании знаний из уровня техники и из коммерческих источников, например, серии векторов pcDNA и pEF от Invitrogen, pMSCV и pTK-Hyg от BD Sciences, pCMV-Script от Stratagene и т. д., которые можно применять для рекомбинантной экспрессии белка, представляющего интерес, или для получения подходящих промоторов и/или последовательностей терминаторов транскрипции, последовательностей polyA и т. п.

Культура клеток может представлять собой любой тип культуры клеток, в том числе адгезивную культуру клеток, например, клетки, прикрепленные к поверхности сосуда для культивирования или к микроносителям, а также суспензионную культуру. Для крупномасштабного культивирования большинства суспензионных культур применяют периодический процесс или периодический процесс с подпиткой, поскольку они являются наиболее простыми для управления и увеличения масштаба. В настоящее время непрерывные процессы, основанные на принципах перфузии, становятся более распространенными, и они также являются подходящими. Подходящие среды для культивирования также хорошо известны специалисту в данной области и могут, как правило, быть получены из коммерческих источников в больших количествах или изготовлены по заказу в соответствии со стандартными протоколами. Культивирование можно проводить, например, в чашках, роллер-флаконах или в биореакторах, используя периодические, подпитываемые, непрерывные системы и т. п. Известны подходящие условия для культивирования клеток (см., например, Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973), и R.I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, fourth edition (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9)).

Настоящее изобретение также предусматривает композиции, содержащие F-белок RSV до слияния, и/или молекулу нуклеиновой кислоты, и/или вектор, которые описаны выше. Таким образом, настоящее изобретение предусматривает композиции, содержащие F-белок RSV до слияния, который имеет эпитоп, который присутствует в конформации F-белка RSV до слияния, но отсутствует в конформации после слияния. Настоящее изобретение также предусматривает композиции, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор, кодирующие такой F-белок RSV до слияния. Настоящее изобретение дополнительно предусматривает иммуногенные композиции, содержащие F-белок RSV до слияния, и/или молекулу нуклеиновой кислоты, и/или вектор, которые описаны выше. Настоящее изобретение дополнительно предусматривает фармацевтические композиции, содержащие F-белок RSV до слияния, и/или молекулу нуклеиновой кислоты, и/или вектор, которые описаны выше, и один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей.

Настоящее изобретение также предусматривает применение стабилизированного F-белка RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектора в соответствии с настоящим изобретением для индуцирования иммунного ответа на F-белок RSV у субъекта. Дополнительно предусмотрены способы индуцирования у субъекта иммунного ответа на F-белок RSV, предусматривающие введение субъекту F-белка RSV до слияния, и/или молекулы нуклеиновой кислоты, и/или вектора в соответствии с настоящим изобретением. Также предусмотрены F-белки RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты и/или векторы в соответствии с настоящим изобретением для индуцирования иммунного ответа у субъекта на F-белок RSV. Дополнительно предусмотрено применение F-белков RSV до слияния, и/или молекул нуклеиновой кислоты, и/или векторов в соответствии с настоящим изобретением для изготовления лекарственного препарата для применения в индуцировании у субъекта иммунного ответа на F-белок RSV.

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

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

средства и/или моноклональные антитела.

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

Для введения субъектам, таким как люди, в настоящем изобретении могут применяться фармацевтические композиции, содержащие F-белок RSV до слияния, молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор, которые описаны в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В контексте настоящего изобретения термин "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель или наполнитель в используемых дозировках и концентрациях не будет вызывать каких-либо нежелательных или неблагоприятных эффектов у субъектов, которым их вводят. Такие фармацевтически приемлемые носители и наполнители хорошо известны из уровня техники (см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). F-белки RSV или молекулы нуклеиновой кислоты предпочтительно составляют и вводят в виде стерильного раствора, хотя также возможно использование лиофилизированных препаратов. Стерильные растворы получают с помощью стерилизующей фильтрации или с помощью других способов, известных per se из уровня техники. Затем растворы лиофилизируют или заполняют ими контейнеры, предназначенные для лекарственных форм. Значение pH раствора, как правило, находится в диапазоне pH 3,0-9,5, например, pH 5,0-7,5. F-белки RSV обычно находятся в растворе, содержащем подходящий фармацевтически приемлемый буфер, и композиция также может содержать соль. Необязательно может присутствовать стабилизирующее средство, такое как альбумин. В некоторых вариантах осуществления добавляют детергент. В некоторых вариантах осуществления F-белки RSV могут быть составлены в виде инъекционного препарата.

В некоторых вариантах осуществления композиция в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержит один или несколько адъювантов. Адъюванты, как известно из уровня техники, дополнительно повышают иммунный ответ в отношении применяемой антигенной детерминанты. Термины "адъювант" и "иммуностимулятор" используются в данном документе взаимозаменяемо, и их определяют как одно или несколько веществ, вызывающих стимуляцию иммунной системы. В данном контексте адъювант используют для усиления иммунного ответа на F-белки RSV по настоящему изобретению. Примеры подходящих адъювантов включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия; композиции в виде масляных эмульсий (или композиции типа масло-в-воде), в том числе сквален-водные эмульсии, такие как MF59 (см., например, WO 90/14837); составы с сапонидами, такие как, например, QS21 и иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS) (см., например, US 5057540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); вещества, происходящие из бактерий или микроорганизмов, примерами которых являются монофосфорил-липид А (MPL), 3-О-деацилированный MPL (3dMPL), олигонуклеотиды, содержащие мотив CpG, ADP-рибозилирующие токсины бактерий или их мутантные формы, такие как термолабильный энтеротоксин LT из *E. coli*, холерный токсин СТ и т. п.; белки эукариотов (например, антитела или их фрагменты (например, направленные против самого антигена или CD1a, CD3, CD7, CD80) и лиганды к рецепторам (например, CD40L, GMCSF, GCSF и т. д.), которые стимулируют иммунный ответ при взаимодействии с реципиентными клетками. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат в качестве адъюванта алюминий, например, в форме гидроксида алюминия, фосфата алюминия, фосфата алюминия-калия или их комбинации, в концентрациях 0,05-5 мг, например, 0,075-1,0 мг алюминия на дозу.

F-белки RSV до слияния можно также вводить в комбинации с наночастицами или в виде конъюгированных с наночастицами, такими как, например, полимеры, липосомы, виросомы, вирусоподобные частицы. F-белки до слияния могут быть комбинированы с наночастицами, инкапсулированы в наночастицах или конъюгированы с наночастицами с адъювантом или без него. Инкапсулирование в липосомы описано, например, в US 4235877. Конъюгирование с макромолекулами раскрыто, например, в US 4372945 или US 4474757. F-белки RSV до слияния также могут быть конъюгированы с самособирающимися белками.

В других вариантах осуществления композиции не содержат адъювантов.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы получения вакцины против респираторного синцитиального вируса (RSV), предусматривающие обеспечение F-белка RSV, нуклеиновой кислоты или вектора в соответствии с настоящим изобретением и помещение его или ее в фармацевтически приемлемую композицию. Термин "вакцина" относится к средству или композиции, содержащим активный компонент, который является эффективным для индуцирования у субъекта определенной степени иммунитета к определенному патогенному

микроорганизму или заболеванию, которые приведут по меньшей мере к снижению (до полного отсутствия включительно) тяжести, продолжительности или другого проявления симптомов, ассоциированных с инфекцией, вызванной патогенным микроорганизмом, или заболеванием. В настоящем изобретении вакцина содержит эффективное количество F-белка RSV до слияния, и/или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей F-белок RSV до слияния, и/или вектор, содержащий указанную молекулу нуклеиновой кислоты, которое вызывает формирование иммунного ответа на F-белок RSV. Это обеспечивает способ предупреждения тяжелого заболевания нижних дыхательных путей, приводящего к госпитализации, и снижает частоту осложнений, таких как пневмония и бронхолит у субъекта вследствие инфекции и репликации RSV. В соответствии с настоящим изобретением, термин "вакцина" подразумевает, что она представляет собой фармацевтическую композицию и, таким образом, обычно включает фармацевтически приемлемые разбавитель, носитель или наполнитель. Она может содержать дополнительные активные ингредиенты или не содержать их. В некоторых вариантах осуществления она может представлять собой комбинированную вакцину, которая дополнительно содержит другие компоненты, которые индуцируют иммунный ответ, например, против других белков RSV и/или против других возбудителей инфекции. Введение дополнительных активных компонентов можно, например, осуществлять путем отдельного введения или путем введения комбинации продуктов из вакцин по настоящему изобретению и дополнительных активных компонентов.

Композиции можно вводить субъекту, например, субъекту-человеку. Суммарная доза F-белков RSV в композиции для однократного введения может составлять, например, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 10 мг, например 1 мкг - 1 мг, например 10 мкг - 100 мкг. Общая доза (аденовирусных) векторов, содержащих ДНК, кодирующую F-белки RSV, в композиции для однократного введения может составлять, например, от приблизительно  $0,1 \times 10^{10}$  в. ч./мл до  $2 \times 10^{11}$ , предпочтительно от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  в. ч./мл до  $2 \times 10^{11}$  в. ч./мл, предпочтительно от  $5 \times 10^{10}$  в. ч./мл до  $1 \times 10^{11}$  в. ч./мл.

Введение композиций в соответствии с настоящим изобретением можно осуществлять с помощью стандартных путей введения. Неограничивающие варианты осуществления включают парентеральное введение, такое как внутривенное, внутримышечное, подкожное, чрескожное введение или введение через слизистые, например, интраназальное, пероральное и т. п. В одном варианте осуществления композицию вводят путем внутримышечной инъекции. Специалисту в данной области известны различные варианты введения композиции, например вакцины, для индуцирования иммунного ответа на антиген(антигены), присутствующий(присутствующие) в вакцине.

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

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

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

## **ПРИМЕРЫ**

ПРИМЕР 1. *Стабильность конформации F-вариантов RSV до слияния в супернатанте культуры*

Последовательность F-белка RSV, которую использовали в качестве контроля для исследования стабильности, была основана либо на консенсусной последовательности подгруппы А (SEQ ID NO: 13), либо на консенсусной последовательности подгруппы В (SEQ ID NO: 14), поскольку консенсусная последовательность будет очень похожа на последовательности дикого типа (не подвергавшиеся пассированию), соответствующие клиническим изолятам (Kumaria et al. (2011)). Для целей выявления F-белки подвергали слиянию на С-конце со strep-меткой. Для оценки стабильности различных точечных мутаций в F-белке RSV с помощью AlphaLISA производили измерение содержания F-белка в конформации до слияния.

Данный анализ проводили путем добавления 5 мкл образца F-белка RSV к 25 мкл смеси из Mab CR9501, специфичного к конформации до слияния (0,8 нМ), акцепторной гранулы, покрытой антителами к IgG человека, и донорных гранул, покрытых Strep-Tactin (Perkin Elmer), в аналитическом буфере. После 2,5 часов инкубации данной смеси при комнатной температуре измеряли хемилюминесцентное излучение при 615 нм. Одновременно с обоими антителами связывался только F-белок RSV в конформации до слияния и, таким образом, он будет давать сигнал в данном анализе. Измерения проводили в дни 0, 4, 11 и 18 после сбора и сравнивали уменьшение сигнала от F-белка до слияния относительно сигнала от F-белка дикого типа и сигнала от F-белка со стабилизирующей мутацией D486N. Нестабильный F-белок до слияния можно идентифицировать по зависящей от времени потере связывания с CR9501 (F-белок дикого

типа и F-D486N), тогда как в случае более стабильных конструкций до слияния в день сбора наблюдали или более высокое содержание F-белка до слияния, и/или более медленное или отсутствующее снижение содержания F-белка до слияния после хранения в течение определенного периода при 4°C по сравнению с контрольным F-белком (например, F-белком дикого типа и F-D486N) без стабилизирующей точечной мутации по настоящему изобретению. На фигуре 3 показано, что добавление одной или нескольких мутаций V76G, I79M, P101S, P101Q, P101T, I152V или Q354L стабилизировало F-белок до слияния по сравнению с вариантом F-D486N подтипа А. На фигуре 4 показано, что добавление одной или нескольких мутаций T152M и/или K226M стабилизировало F-белок до слияния по сравнению с вариантом F-D486N подтипа В.

ПРИМЕР 2. *Получение стабильных F-полипептидов RSV до слияния - стабилизирующие мутации*

Растворимый белок до слияния на основе консенсусной последовательности F-белка RSV (SEQ ID NO: 13 или 14) не удавалось очистить из-за очевидной нестабильности (как показано на фигурах 3, 4). Для оценки некоторых стабилизирующих мутаций, показанных на фигуре 3, получали F-белок RSV (RSV180305; SEQ ID NO: 20) с двумя мутациями, которые стабилизировали конформацию до слияния, в частности с мутациями P101Q и I152V, в дополнение к ранее описанной стабилизирующей мутации D486N (Kragup et. al., 2015). Дополнительно получали другой стабилизированный F-белок до слияния (RSV172527; SEQ ID NO: 21), в котором замены P101Q и I152V были введены в F-белок RSV до слияния, который уже содержал несколько ранее описанных стабилизирующих замен, в частности мутации S46G, L203I, S215P, T357R, N371Y, D486N и D489Y. Конструкции синтезировали и подвергали оптимизации по кодонам в Gene Art (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния). Конструкции клонировали в pCDNA2004 или создавали с помощью стандартных способов, широко известных в данной области, включая сайт-направленный мутагенез и ПЦР, и проводили секвенирование. Используемой платформой экспрессии были клетки HEK293. Клетки подвергали временной трансфекции с помощью 293Fectin (Life Technologies) в соответствии с инструкциями изготовителя и культивировали в течение 5 или 6 дней при 37°C и 10% CO<sub>2</sub>. Супернатант культуры собирали и центрифугировали в течение 5 минут при 300 g для удаления клеток и клеточного дебриса. Отцентрифугированный супернатант затем подвергали стерилизующей фильтрации с применением вакуумного фильтра с размером пор 0,22 мкм и хранили при 4°C до применения.

F-белки RSV до слияния очищали с помощью протокола двухэтапной очистки, предусматривающего либо использование колонки для аффинной хроматографии с С-меткой CaptureSelect<sup>TM</sup> в случае меченого с помощью С-метки белка RSV180305, либо, в случае немеченого белка RSV172527, с помощью катионообмена при pH 5,0 (колонка HiTrap Capto SP ImpRes; GE Healthcare Biosciences, Питтсбург, Пенсильвания, США) с последующим анионным обменом с применением колонки Resource-Q. Как RSV180305 (SEQ ID NO: 20), так и RSV172527 (SEQ ID NO: 21) подвергали дополнительной очистке с

помощью эксклюзионной хроматографии с применением колонки Superdex 200 (GE Healthcare), как показано на фигуре 5a и b соответственно. После хранения при 4°C в течение 4 недель SEC-MALS-анализ объединенных образцов показал, что очищенные белки были тримерными, а также было обнаружено, что очищенный RSV180305 содержал незначительную фракцию агрегатов.

#### ПРИМЕР 3. SDS-PAGE-анализ.

Очищенный RSV172527 анализировали на гелях NuPAGE с добавлением 4-12% (вес/объем) Bis-Tris, 1 x MOPS (Life Technologies) в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях. Все процедуры проводили в соответствии с инструкциями производителя. Для анализа степени чистоты гели окрашивали красителем Krypton Infrared Protein Stain (Thermo Scientific). Невосстановленный и восстановленный RSV172527 был чистым, а полосы были видны на ожидаемой для эктодомена высоте F<sub>0</sub> и F<sub>1</sub> высоте соответственно.

#### ПРИМЕР 4. ELISA

После хранения при 4°C в течение 4 недель связывание очищенных F-белков RSV RSV180305, RSV172725 до слияния и контрольного F-белка до слияния (RSV150042) (SEQ ID NO: 22, который описан ранее в WO2017/174568, со специфичными к конформации до слияния нейтрализующими антителами тестировали в ELISA. Планшеты 1/2 AreaPlate-96 HB (белые, с высокой аффинностью связывания белка (PerkinElmer)) покрывали тестовой панелью моноклональных антител к RSV. Mab CR9501 и CR9502 являются специфичными в отношении конформации F-белка RSV до слияния, а Mab CR9506 связывается с F-белком RSV в конформации как до, так и после слияния. CR9506 конкурирует с мотавизумабом (данные не представлены) и связывается с тем же линейным эпитопом. Антитела разводили в PBS до концентрации 1 мкг/мл и наносили покрытием на планшеты в течение ночи при 4°C в PBS. На следующий день планшеты промывали промывочным буфером (PBS, 0,05% Tween) и подвергали блокировке в PBS с 1% бычьим сывороточным альбумином. Все инкубации производили при комнатной температуре в течение 1 ч. После каждого этапа планшеты трижды промывали промывочным буфером. Готовили различные титры очищенного F-белка RSV в промывочном буфере с 1% бычьим сывороточным альбумином. CR9506 подвергали биотинилированию в соответствии со стандартной процедурой и использовали в количестве 0,05 мкг/мл с субстратом BM Chemiluminescence ELISA (POD) (Sigma Aldrich) для выявления. Как видно на фигуре 7, все очищенные F-белки RSV таким же образом связывались с Mab, специфичными к конформации до слияния (CR9501 и CR9502), и Mab, которое специфично к обоим конформациям (CR9506), таким образом демонстрируя, что F-белки в соответствии с настоящим изобретением имели конформацию до слияния.

#### ПРИМЕР 5. Термостабильность F-белков RSV

Термостабильность очищенных белков определяли с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF). Очищенный F-белок до слияния смешивали с оранжевым флуоресцентным красителем SYPRO (Life Technologies S6650) в 96-луночном

планшете для оптической qPCR. Оптимальную концентрацию красителя и белка определяли экспериментально (данные не показаны). Разведения белка выполняли в PBS, а в качестве вычитаемого эталонного значения использовали значения образца отрицательного контроля, содержащего только краситель. Измерение проводили с помощью прибора для qPCR (Applied Biosystems ViiA 7) с использованием следующих параметров: температурный диапазон 25-95°C со скоростью 0,015°C в секунду. Данные собирали в непрерывном режиме. Кривые плавления строили с применением программного обеспечения GraphPad PRISM (версия 5.04). Значения температуры плавления рассчитывали при 50% значении максимальной флуоресценции с применением нелинейного уравнения сдвига EC50. Температура плавления RSV180305 составляла 65,9 градусов (фиг. 8a), а в случае RSV172527 составляла 72,9 (фиг. 8b). Эталонный F-белок RSV до слияния (RSV150042) имел температуру плавления 65,0 (данные не представлены).

**Таблица 1.** Стандартные аминокислоты, сокращения и свойства

<b>Аминокислот а</b>	<b>3- буквенны й код</b>	<b>1- буквенны й код</b>	<b>Полярност ь боковой цепи</b>	<b>Заряд боковой цепи (рН 7,4)</b>
аланин	Ala	A	неполярная	Нейтральный
аргинин	Arg	R	полярная	Положительный
аспарагин	Asn	N	полярная	Нейтральный
аспарагиновая кислота	Asp	D	полярная	Отрицательный
цистеин	Cys	C	неполярная	Нейтральный
глутаминовая кислота	Glu	E	полярная	Отрицательный
глутамин	Gln	Q	полярная	Нейтральный
глицин	Gly	G	неполярная	Нейтральный
гистидин	His	H	полярная	Положительный (10%), нейтральный (90%)
изолейцин	Ile	I	неполярная	Нейтральный
лейцин	Leu	L	неполярная	Нейтральный
лизин	Lys	K	полярная	Положительный
метионин	Met	M	неполярная	Нейтральный
фенилаланин	Phe	F	неполярная	Нейтральный
пролин	Pro	P	неполярная	Нейтральный
серин	Ser	S	полярная	Нейтральный

треонин	Thr	T	полярная	Нейтральный
триптофан	Trp	W	неполярная	Нейтральный
тирозин	Tyr	Y	полярная	Нейтральный
валин	Val	V	неполярная	Нейтральный

**Таблица 2.** Аминокислотные последовательности антител CR9501 и CR9502

Ab	Домен VH	CDR1 VH	CDR2 VH	CDR3 VH
<b>CR9501</b>	Аминокислоты 1-125 из SEQ ID NO: 16	GASINSDNYW (SEQ ID NO:1)	HISYTGNTYYTPSLK S (SEQ ID NO:2)	CGAYVLISNCGW FDS (SEQ ID NO:3)
<b>CR9502</b>	Аминокислоты 1-121 из SEQ ID NO: 18	GFTFSGHITIA (SEQ ID NO:7)	WVSTNNGNTEYAAQ KIQG (SEQ ID NO:8)	EWLVMGGFAFD H (SEQ ID NO:9)
Ab	Домен VL	CDR1 VL	CDR2 VL	CDR3 VL
<b>CR9501</b>	Аминокислоты 1-107 из SEQ ID NO: 17	QASQDISTYLN (SEQ ID NO: 4)	GASNLET (SEQ ID NO:5)	QQYQYLPYT (SEQ ID NO:6)
<b>CR9502</b>	Аминокислоты 1-110 из SEQ ID NO: 19	GANNIGSQNV H (SEQ ID NO:10)	DDRDRPS (SEQ ID NO:11)	QVWDSSRDQAVI (SEQ ID NO:12)

### Последовательности

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

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSV  
ITIELSNIKENKCNNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPAANNRARRLPRFM  
NYTLNNAKKTNTVLSKRRKRRFLGFLGVSIAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKIKSALLST  
NKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPVINKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITR  
EFSVNAGVTPPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEV  
LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQA  
ETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVS  
CYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEP  
IINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNVGKSTTNIMITTHIIVIL  
LSLIAVGLLLYCKARSTPVTLTKDQLSGINNIASFN

Эктодомен консенсусной последовательности F-белка RSV подтипа B (SEQ ID NO: 14)

MELLIHRSSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVI

TIELSNIKETKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARRREAPQYM  
 NYTINTTKNLNVSISKRRRFLGFLGVSASIAVSKVLHLEGEVNIKIKNALLSTN  
 KAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYINNQLLPVNNQSCRISNIETVIEFQQKNSRLLLEITREF  
 SVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVL  
 YVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTC  
 KVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGK  
 TKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKNLYVKGEPIINYY  
 DPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELL

**SEQ ID NO: 15 (фибрин)**

GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

**Тяжелая цепь CR9501 (SEQ ID NO: 16):**

QVQLVQSGPGLVKPSQTLALTCNVSGASINSDNYWTWIRQRPGGGLEWIGHIS  
 YTGNTYYTPSLKSRLSMSLETSQSQFSLRLTSVTAADSAVYFCAACGAYVLISNCGWFD  
 SWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKKVEPKSC

**Легкая цепь CR9501 (SEQ ID NO: 17):**

EIVMTQSPSSLSASIGDRVTITCQASQDISTYLNWYQQKPGQAPRLLIYGASNLET  
 GVPSRFTGSGYGTDFSVTISSLQPEDIATYYCQQYQYLPYTFAPGKVEIKRTVAAPSVFI  
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS  
 STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**Тяжелая цепь CR9502 (SEQ ID NO: 18):**

EVQLLQSGAELKKPGASVKISCKTSGFTFSGHTIAWVRQAPGQGLEWMGWVST  
 NNGNTEYAQKIQRVTMTMDTSTSTVYMELRSLTSDDTAVYFCAREWLVMGGFAFDH  
 WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC

**Легкая цепь CR9502 (SEQ ID NO: 19):**

QSVLTQASSVSVAPGQTARITCGANNIGSQNVHWYQQKPGQAPVLLVYDDRDR  
 PSGIPDRFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRDQAVIFGGGTKLTVLGQP  
 KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS  
 NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTIAPTECS

**RSV180305 (SEQ ID NO:20)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSV  
 ITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTQAANNRARRRELPRFM  
 NYTLNNAKKTNTVLSKRRRFLGFLGVSASIAVSKVLHLEGEVNIKIKSALLST  
 NKAUVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITR  
 EFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVL  
 LA YVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQA  
 ETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVS  
 CYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEP  
 IINFYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDG

EWVLLSTFLGGSEPEA**RSV172527 (SEQ ID NO: 21)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSV  
 ITIELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTQAANNRARRRELPRFM  
 NYTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLGVSASGVAVSKVLHLEGEVKNIKSALLST  
 NKA VVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQILPIV NKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITRE  
 FSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVL  
 AYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSGNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAE  
 RCKVQSNRVFCDTMYSLTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSC  
 YGKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPII  
 NFYDPLVFPSNEFYASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGOAYVRKDGE  
WVLLSTFL

**RSV150042 (SEQ ID NO: 22)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSV  
 ITIELSNIKEIKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRRELPRFMN  
 YTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLGVSASGVAVSKVLHLEGEVKNIKSALLSTN  
 KAVVLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIV NKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREF  
 SVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVL  
 AYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSGNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAE  
 TCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSC  
 YGKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPII  
 NFYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGOAYVRKDGE  
WVLLSTFL

**Тяжелая цепь CR9506 (SEQ ID NO: 25)**

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSCKASGGTFSRSLITWVRQAPGQGLEWMGEISLV  
 FGS AKNAQKFQGRVTITADESTSTAHMEMISLKHEDTAVYYCAAHQYGSNGTHNNFWD  
 ESELRFDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS  
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV  
 PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
 KTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**Легкая цепь CR9506 (SEQ ID NO: 26)**

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTIACRASQSIGTYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ  
 SGVPSRFSGSGSGTHFTLAISSLQAEDFATYSCQSQSYTIPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVEI  
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS  
 STLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**Литературные источники**

Krarup et al., Nature Comm. 6:8143, (2015)

Kumaria et al., Virology Journal, 8: 372, (2011);

Letarov et al., *Biochemistry Moscow* 64: 817-823 (1993);  
McLellan, et al. *Science* 342, 592-598 (2013);  
McLellan, et al. *Nat Struct Mol Biol* 17, 248-250 (2010);  
McLellan, et al. *Science* 340, 1113-1117 (2013);  
S-Guthe et al., *J. Mol. Biol.* 337: 905-915. (2004).  
Swanson, et al. (2011)

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный белок слияния (F) респираторно-синцитиального вируса (RSV) до слияния, содержащий одну или более стабилизирующих аминокислот, где одна или более стабилизирующих аминокислот присутствуют в положениях 79, 101, 152, 226 и/или в положении 354, необязательно в комбинации со стабилизирующей аминокислотой в положении 486.

2. Рекомбинантный белок слияния (F) респираторно-синцитиального вируса (RSV) до слияния по п.1, где аминокислота в положении 79 представляет собой M, аминокислота в положении 101 представляет собой S, Q или T, аминокислота в положении 152 представляет собой V или M, аминокислота в положении 226 представляет собой M, и/или аминокислота в положении 354 представляет собой L, и где необязательно аминокислота в положении 486 представляет собой N.

3. Рекомбинантный белок слияния (F) респираторно-синцитиального вируса (RSV) до слияния по п.1 или п.2, содержащий одну или более стабилизирующих мутаций, выбранных из группы, состоящей из мутации аминокислотного остатка в положении 79, мутации аминокислотного остатка в положении 101, мутации аминокислотного остатка в положении 152, мутации аминокислотного остатка в положении 354 и мутации аминокислотного остатка в положении 226, необязательно в комбинации с мутацией аминокислоты в положении 486.

4. Рекомбинантный F-белок до слияния по п.3, содержащий мутацию аминокислотного остатка в положении 486, предпочтительно мутацию по типу замены аминокислоты D в положении 486 на N (D486N), в комбинации с одной или несколькими стабилизирующими мутациями, выбранными из группы, состоящей из мутации аминокислотного остатка в положении 79, мутации аминокислотного остатка в положении 101, мутации аминокислотного остатка в положении 152, мутации аминокислотного остатка в положении 354 и мутации аминокислотного остатка в положении 226.

5. Рекомбинантный F-белок до слияния по п.3 или п.4, где мутация аминокислотного остатка в положении 79 представляет собой мутацию по типу замены аминокислоты изолейцин (I) на метионин (M).

6. Рекомбинантный F-белок до слияния по п.3 или п.4, где мутация аминокислотного остатка в положении 101 представляет собой мутацию по типу замены аминокислоты пролин (P) на серин (S), глутамин (Q) или треонин (T).

7. Рекомбинантный F-белок до слияния по п.3 или п.4, где мутация аминокислотного остатка в положении 152 представляет собой мутацию по типу замены аминокислоты изолейцин (I) на валин (V) или метионин (M).

8. Рекомбинантный F-белок до слияния по п.3 или п.4, где мутация аминокислотного остатка в положении 354 представляет собой мутацию по типу замены аминокислоты глутамин (Q) на лейцин (L).

9. Рекомбинантный F-белок до слияния по п.3 или п.4, где мутация

аминокислотного остатка в положении 226 представляет собой мутацию по типу замены аминокислоты лизин (К) на метионин (М).

10. Рекомбинантный F-белок до слияния по любому из пп. 1-9, где рекомбинантный F-белок до слияния содержит две или более стабилизирующих мутаций.

11. Рекомбинантный F-белок до слияния по любому из пп. 1-9, где рекомбинантный F-белок до слияния содержит три или более стабилизирующих мутаций.

12. Рекомбинантный F-белок до слияния по любому из пп. 1-9, где рекомбинантный F-белок до слияния содержит три или более стабилизирующих мутаций.

13. Рекомбинантный F-белок до слияния по любому из пп. 1-9, где рекомбинантный F-белок до слияния содержит четыре или более стабилизирующих мутаций.

14. Рекомбинантный F-белок до слияния по любому из пп. 1-9, где рекомбинантный F-белок до слияния содержит пять или более стабилизирующих мутаций.

15. Рекомбинантный F-белок до слияния по любому из пп. 1-9, где рекомбинантный F-белок до слияния содержит шесть или более стабилизирующих мутаций.

16. F-белок RSV до слияния по любому из пп. 1-15, где белок содержит по меньшей мере один эпитоп, который является специфическим для конформации F-белка до слияния, где по меньшей мере один эпитоп распознается моноклональным антителом, специфичным к конформации до слияния, содержащим CDR1-участок тяжелой цепи под SEQ ID NO: 1, CDR2-участок тяжелой цепи под SEQ ID NO: 2, CDR3-участок тяжелой цепи под SEQ ID NO: 3 и CDR1-участок легкой цепи под SEQ ID NO: 4, CDR2-участок легкой цепи под SEQ ID NO: 5 и CDR3-участок легкой цепи под SEQ ID NO: 6, и/или моноклональным антителом, специфичным к конформации до слияния, содержащим CDR1-участок тяжелой цепи под SEQ ID NO: 7, CDR2-участок тяжелой цепи под SEQ ID NO: 8, CDR3-участок тяжелой цепи под SEQ ID NO: 9 и CDR1-участок легкой цепи под SEQ ID NO: 10, CDR2-участок легкой цепи под SEQ ID NO: 67 и CDR3-участок легкой цепи под SEQ ID NO: 11.

17. F-белок RSV до слияния по любому из пп. 1-16, где белок является тримерным.

18. F-белок RSV до слияния по любому из пп. 1-17, содержащий усеченный домен F1 и гетерологичный домен тримеризации, связанный с указанным усеченным доменом F1.

19. F-белок RSV до слияния по п.18, где гетерологичный домен тримеризации содержит аминокислотную последовательность GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 15).

20. F-белок RSV до слияния по п.18 или п.19, где домен тримеризации связан с аминокислотным остатком 513 F-белка RSV.

21. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая F-белок RSV до слияния по любому из пп. 1-20.

22. Молекула нуклеиновой кислоты по п.21, где молекула нуклеиновой кислоты была оптимизирована по кодонам для экспрессии в клетках млекопитающего.

23. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.21 или п.22.

24. Композиция, содержащая F-белок RSV до слияния по любому из пп. 1-20, молекулу нуклеиновой кислоты по п.21 или п.22 и/или вектор по п.23.

25. F-белок RSV до слияния по любому из пп. 1-20, молекула нуклеиновой кислоты по п.21 или п.22 и/или вектор по п.23 для применения в индукции иммунного ответа на F-белок RSV.

26. F-белок RSV до слияния по любому из пп. 1-20, молекула нуклеиновой кислоты по п.21 или п.22 и/или вектор по п.23 для применения в качестве вакцины.

27. F-белок RSV до слияния по любому из пп. 1-20, молекула нуклеиновой кислоты по п.21 или п.22 и/или вектор по п.23 для применения в профилактике и/или лечении инфекции, вызванной RSV.

По доверенности

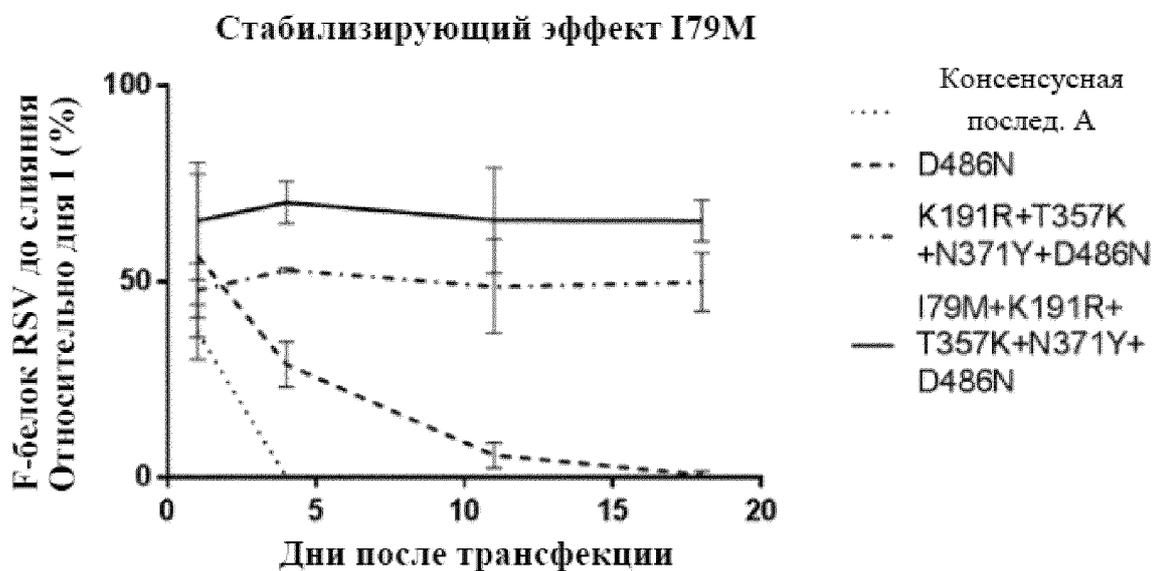
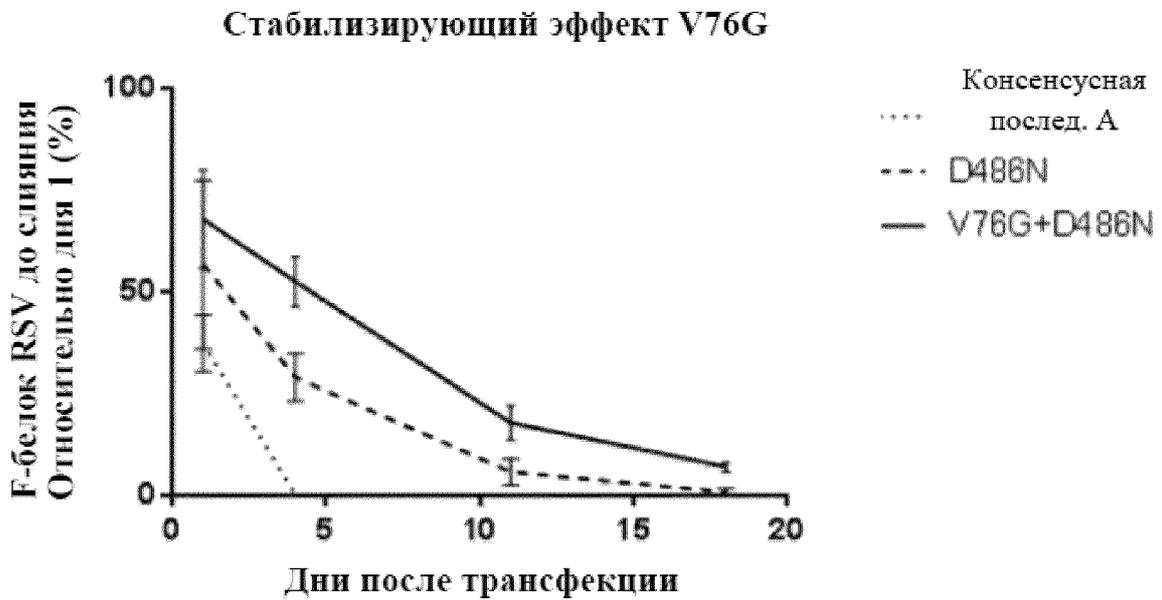
1/15

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKG  
YLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGTDAKVLIKQELDKY  
KNAVTELQLLMQSTPAANNRARELPRFMNYTLNNAKKTNVTL  
SKKRKRRFLGFLGVSASIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKSALL  
STNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPIVNKQSCSIS  
NIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELL  
SLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVV  
QLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCD  
NAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLTPSEVNLCNVDIF  
NPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRG  
IIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEP  
IINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAI  
GGYIPEAPRDGOAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO:  
13)

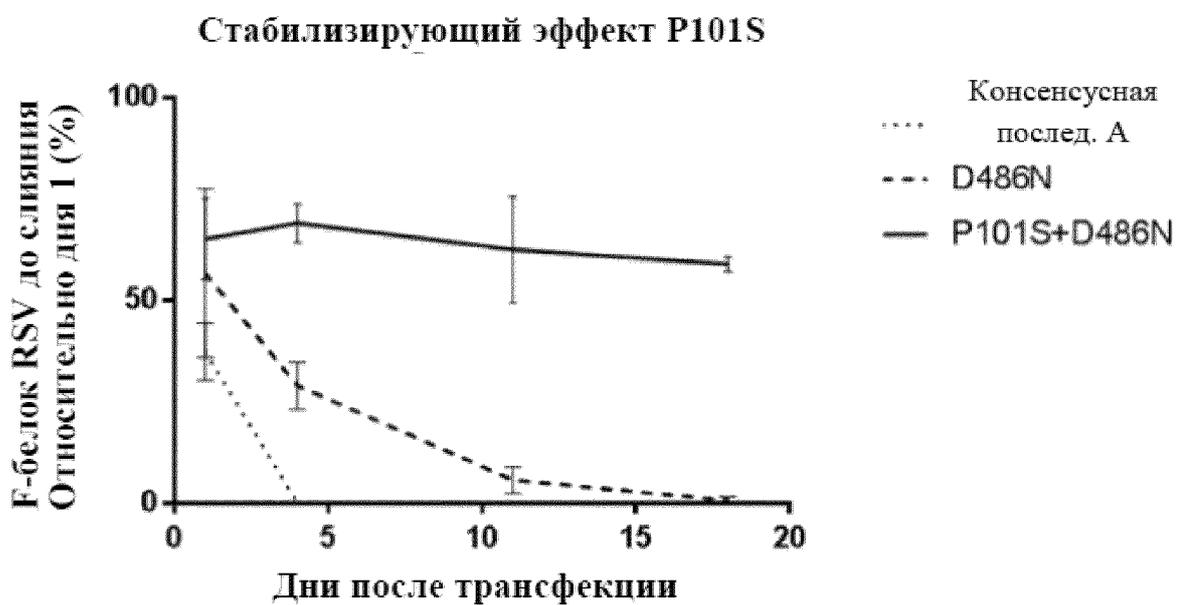
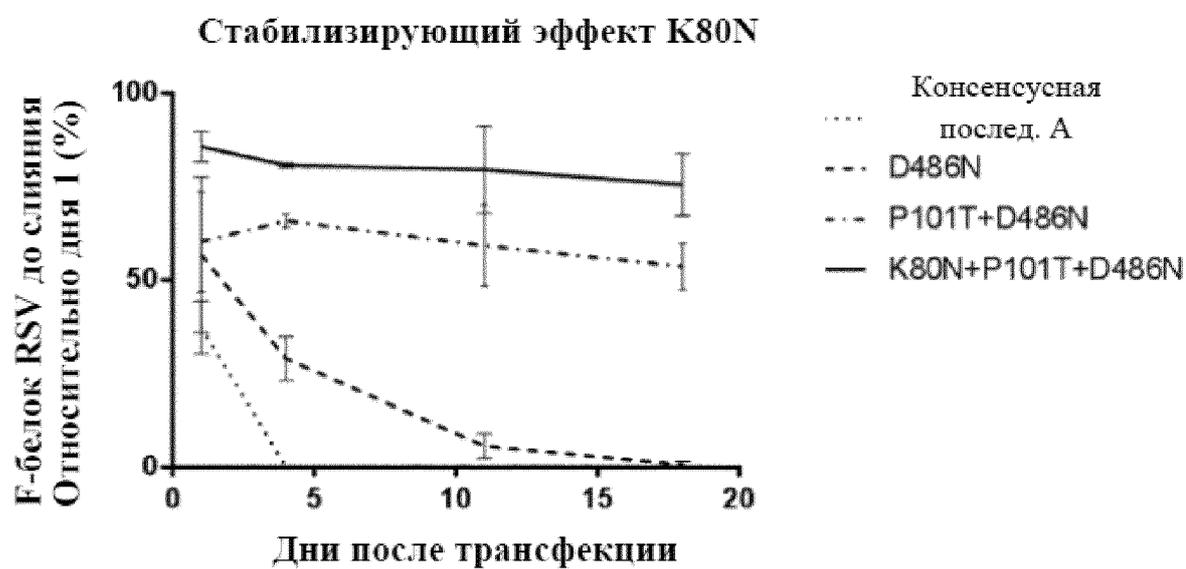
**Фиг. 1**

MELLIHRSSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRG  
YFSALRTGWYTSVITIELSNIKETKCNNGTDTKVKLIKQELDKY  
KNAVTELOQLLMQNTPAANNRARRREAPQYMNYTINTTKNLNVS  
SKKRKRRLGFLGVSASIAVSKVLHLEGEVNIKNALL  
STNKAVVSLSNVSVLTSKVLDLKNYINNQLLPVNVQQSCRIS  
NIETVIEFQQKNSRLLEITREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSSELL  
SLINDMPITNDQKMLMSSNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVV  
QLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWYCD  
NAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIF  
NSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRG  
IIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKNLYVKGEP  
IINYDPLVFPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAI  
GGYIPEAPRDGOAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO:  
14)

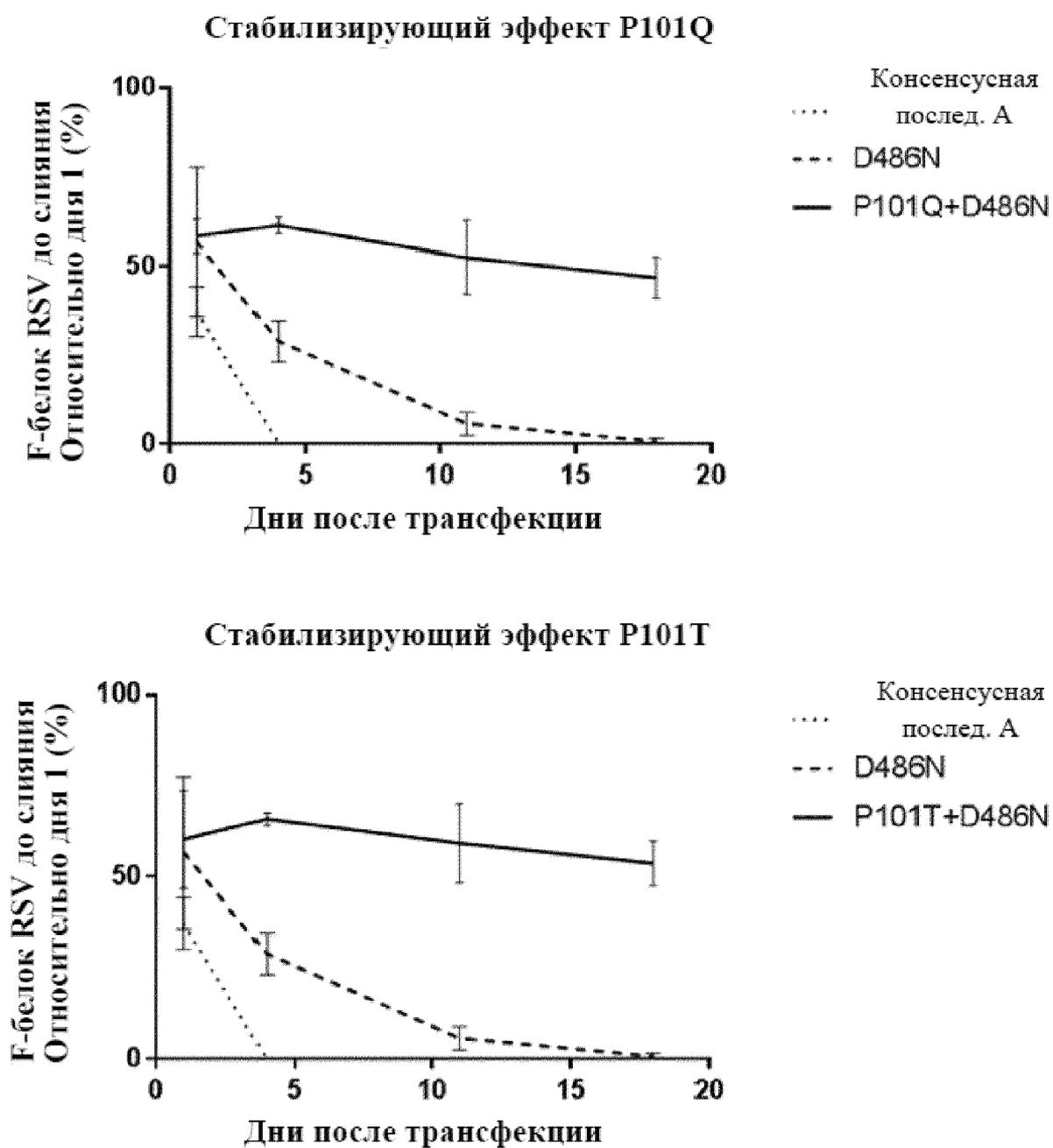
**Фиг. 2**



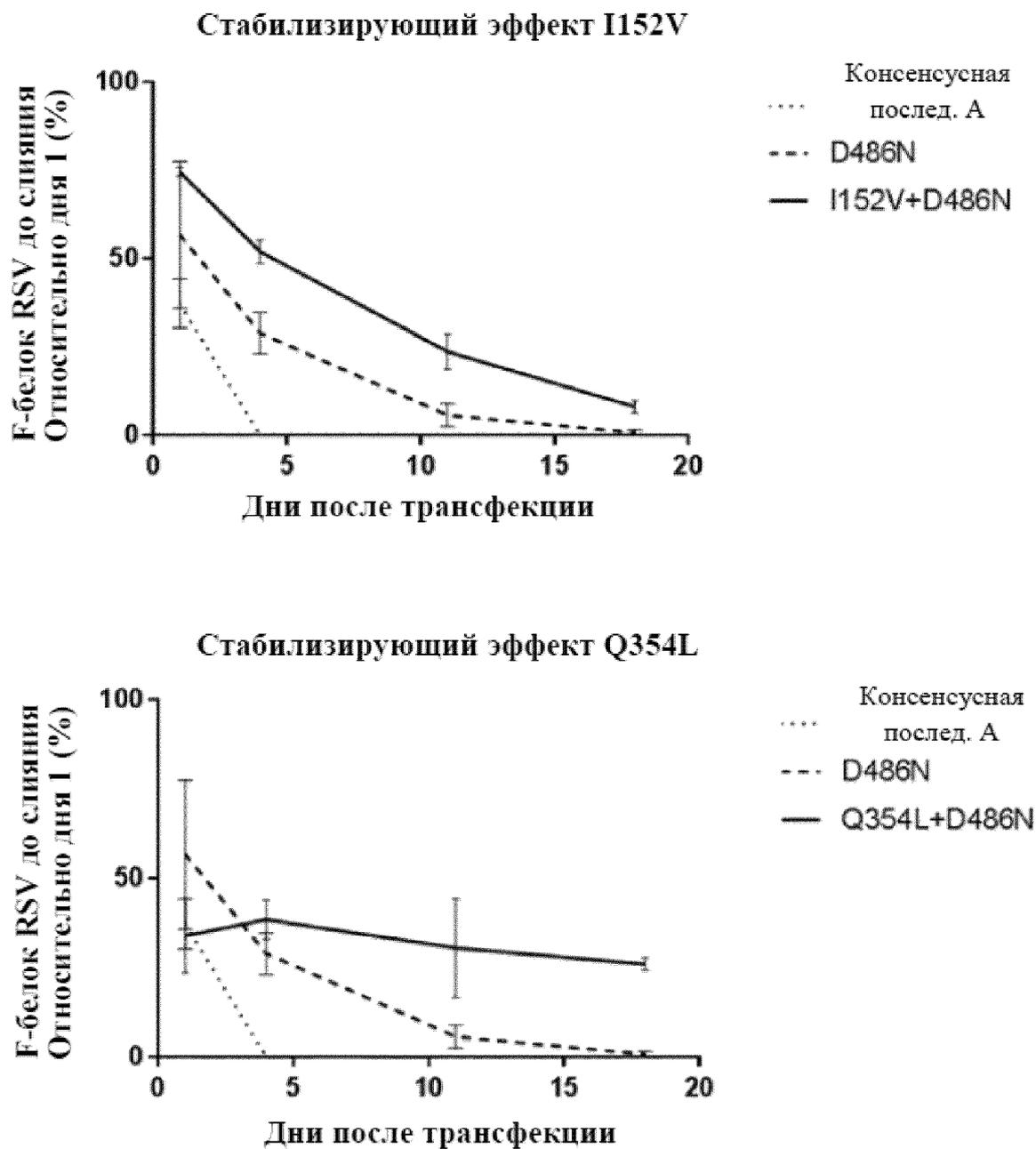
Фиг. 3

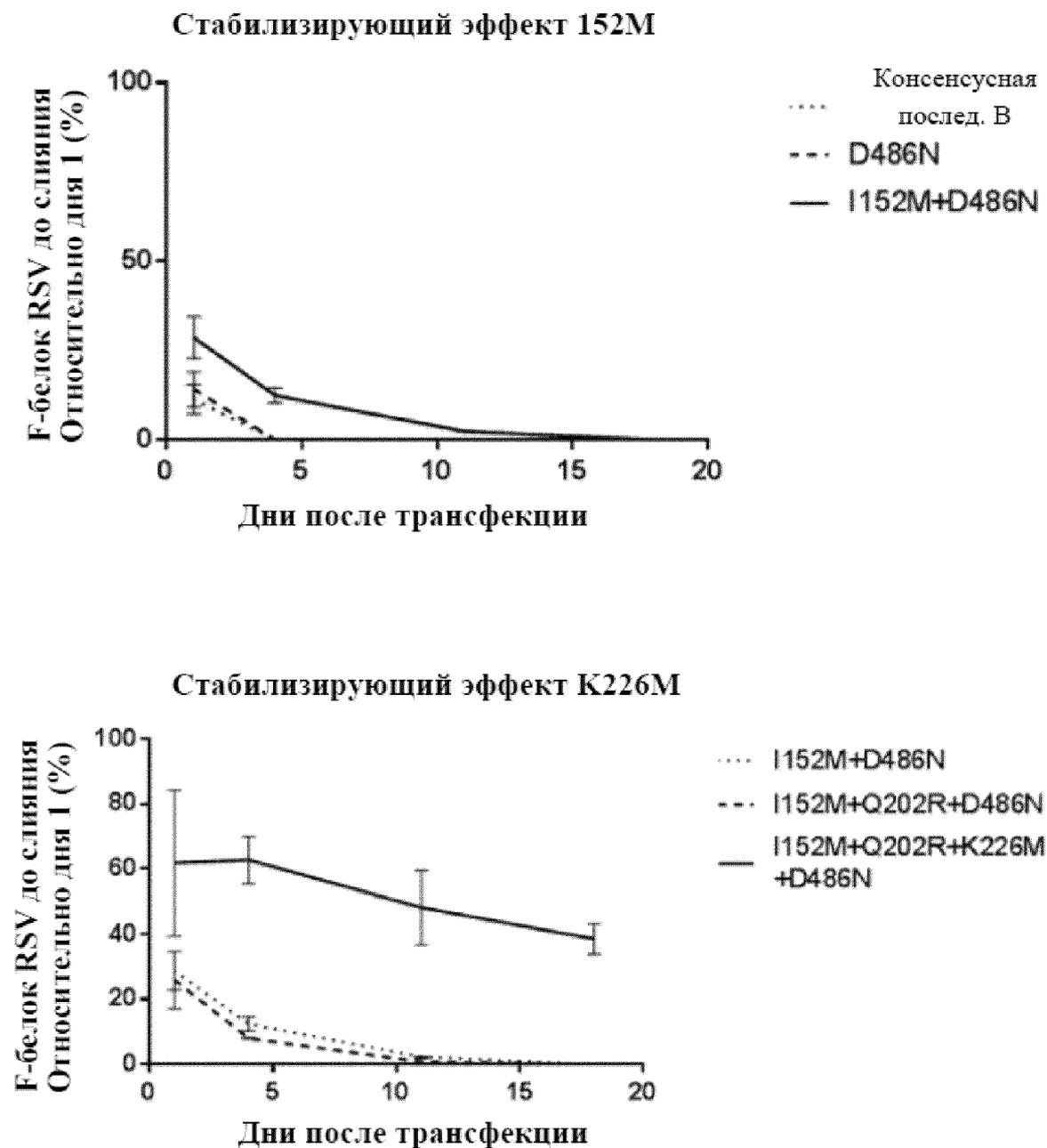


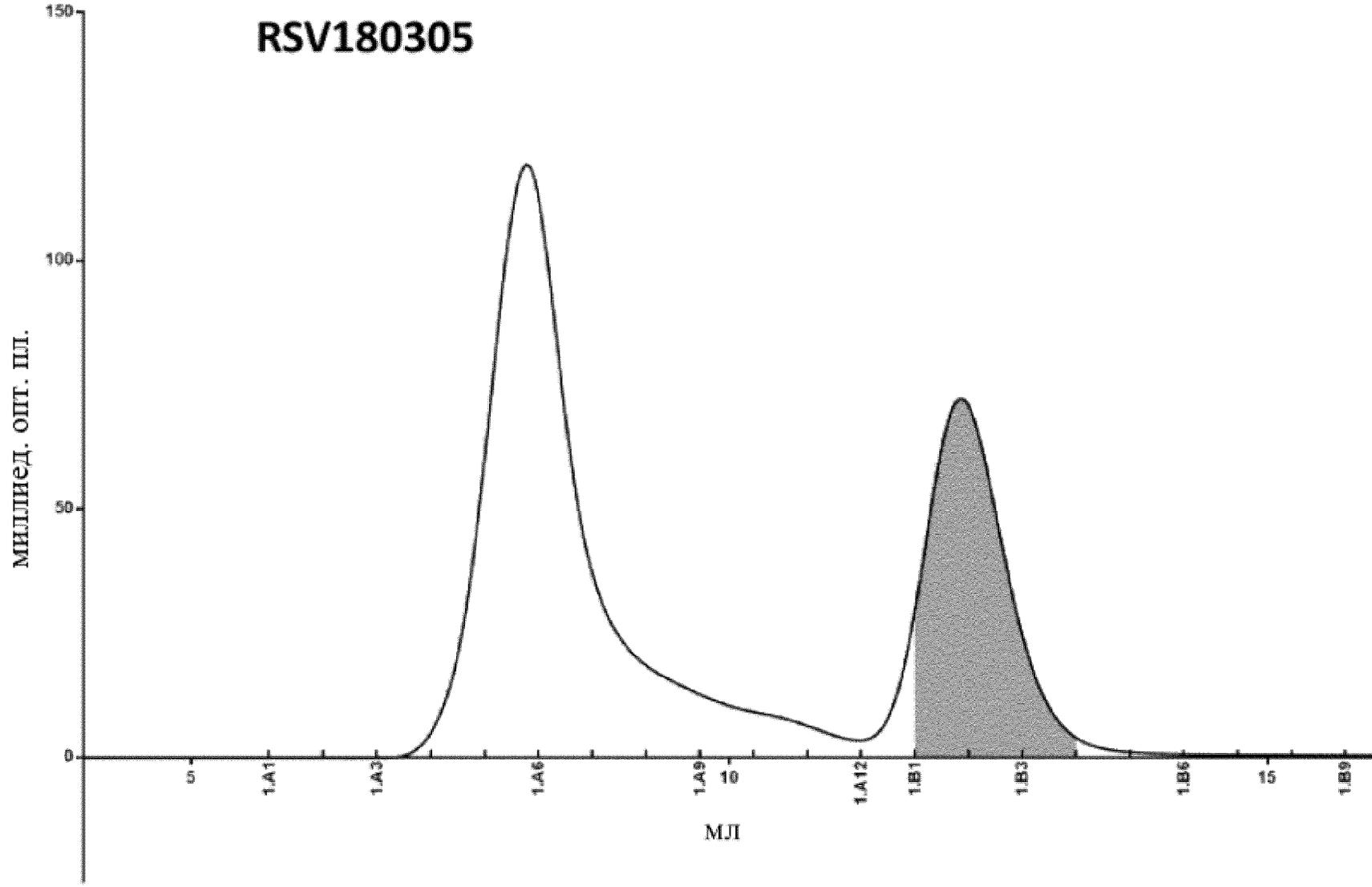
Фиг. 3 - продолжение



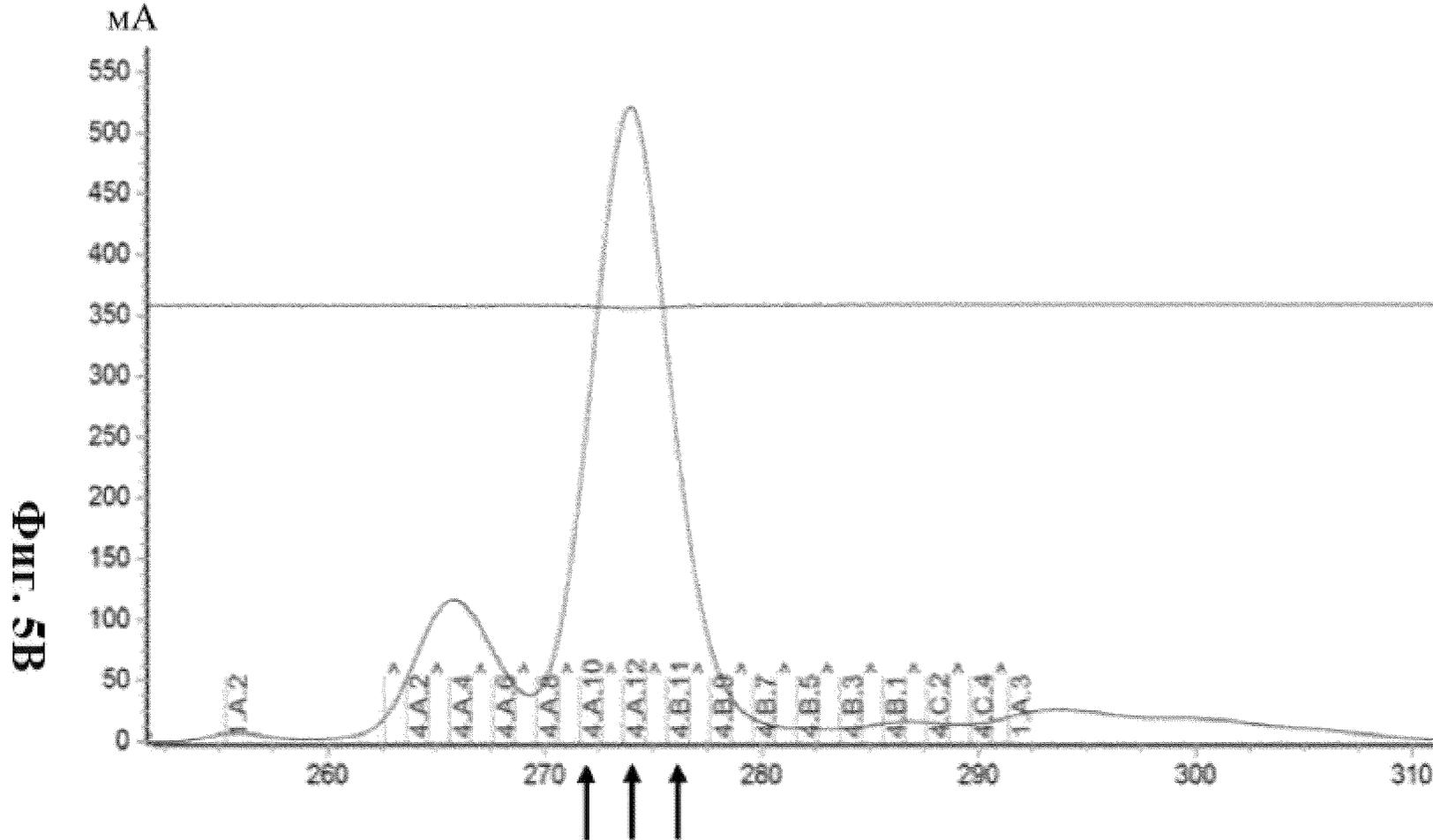
Фиг. 3 - продолжение



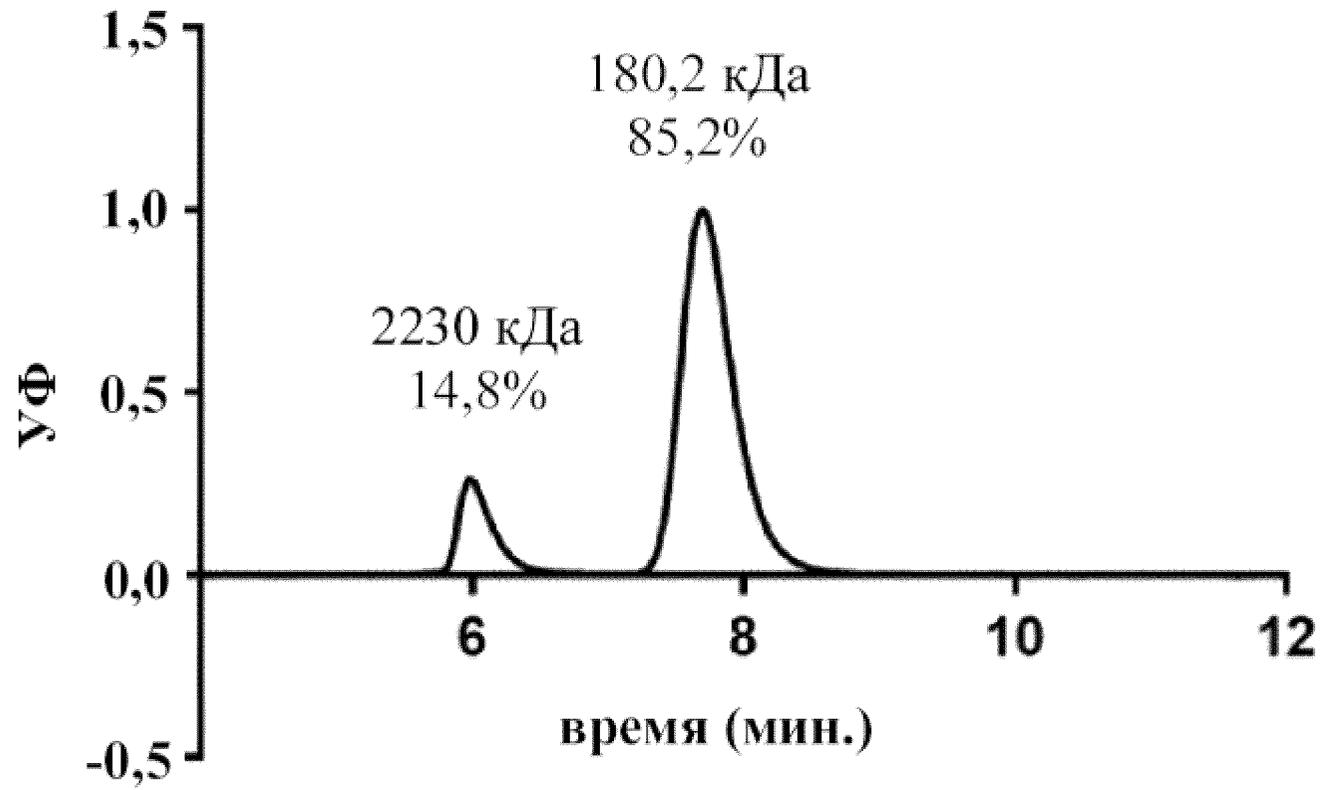




# RSV172527



# RSV180305

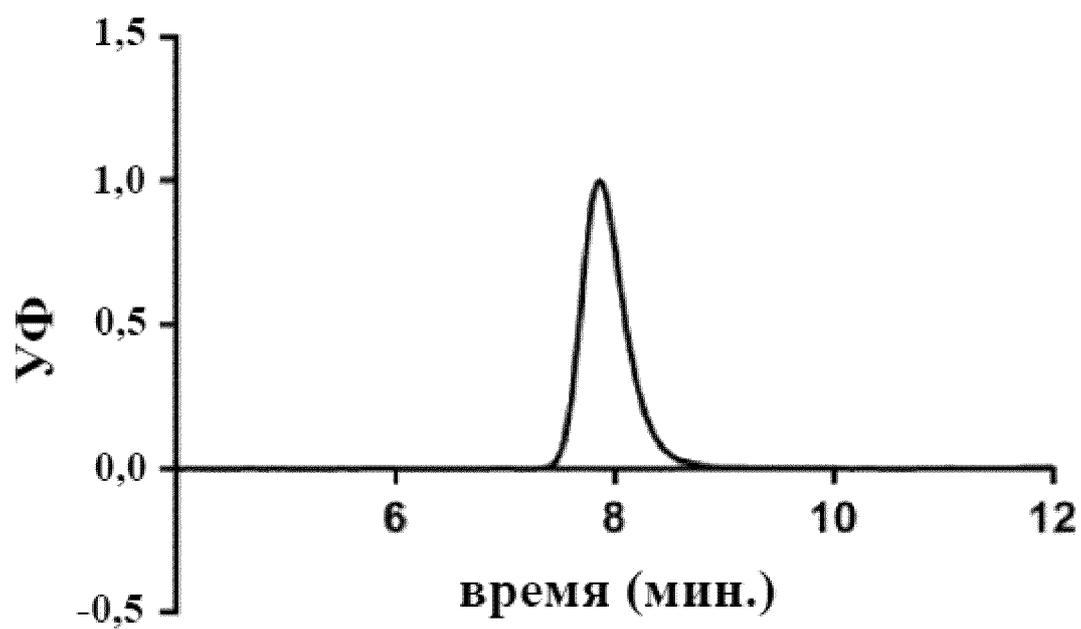


Фиг. 5С

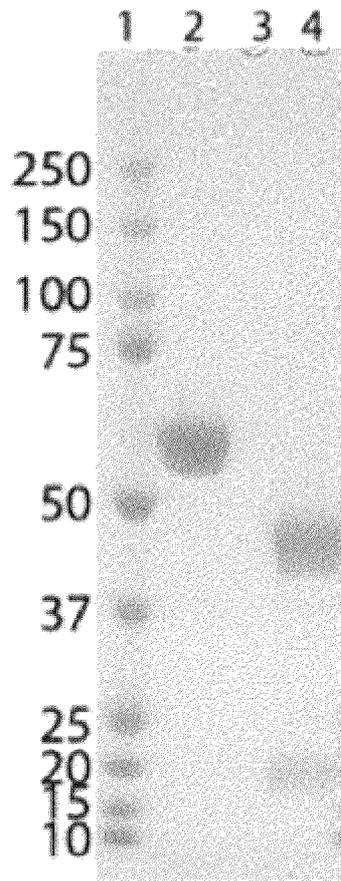
10/15

11/15

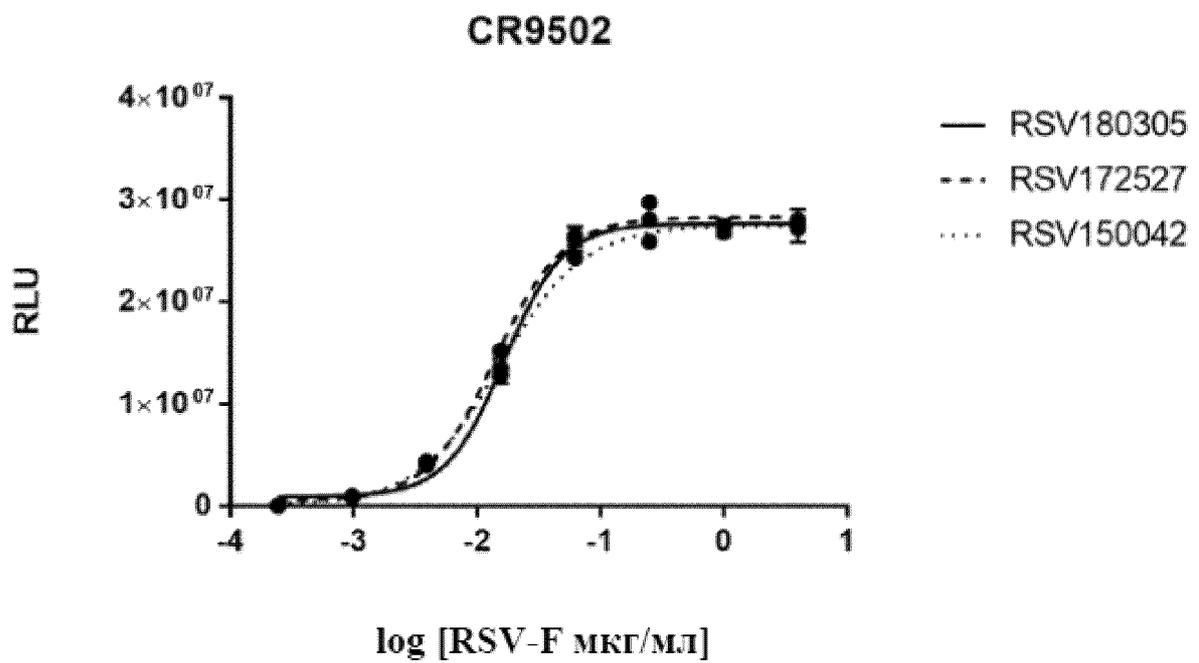
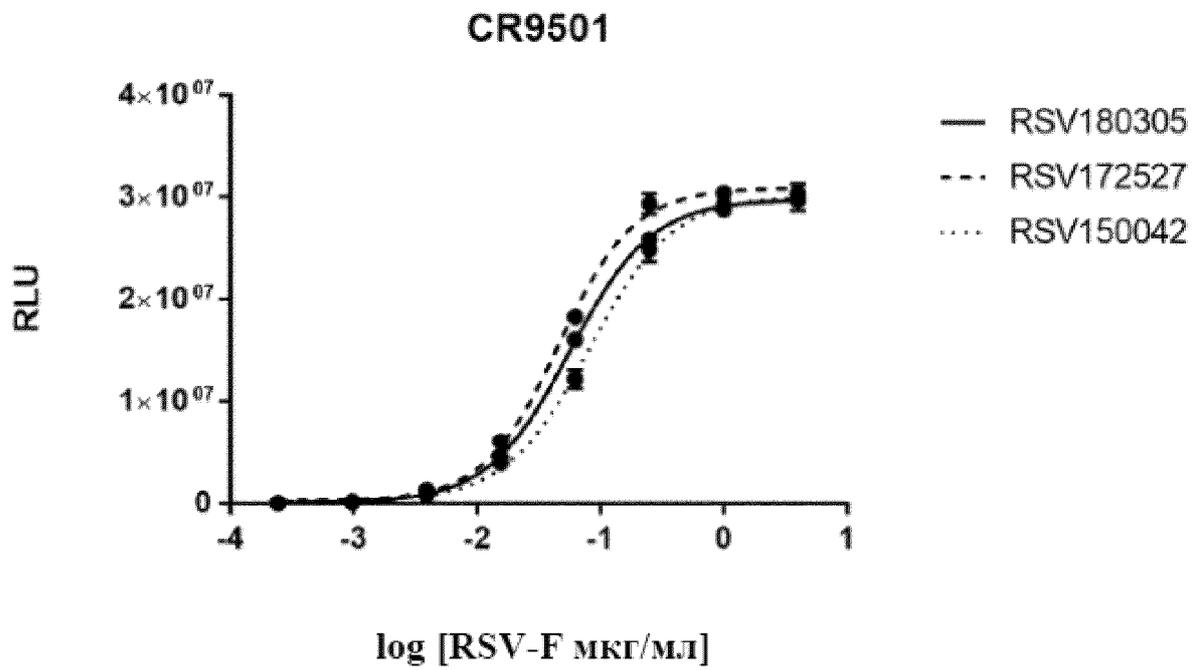
**RSV172527**



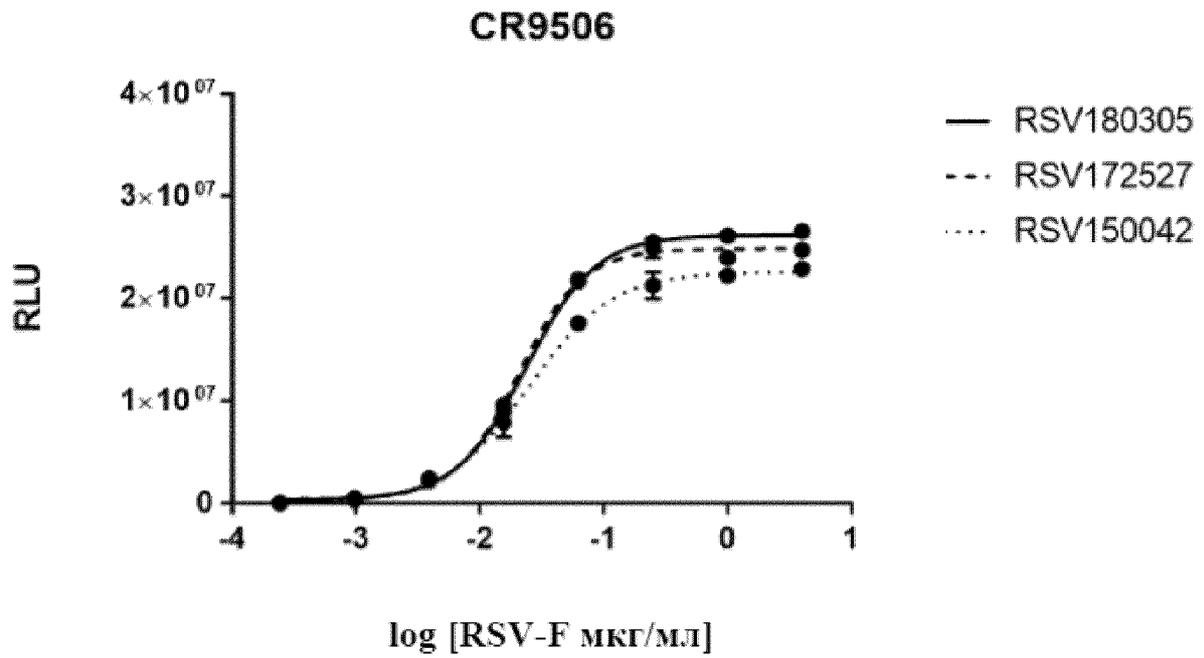
**Фиг. 5D**



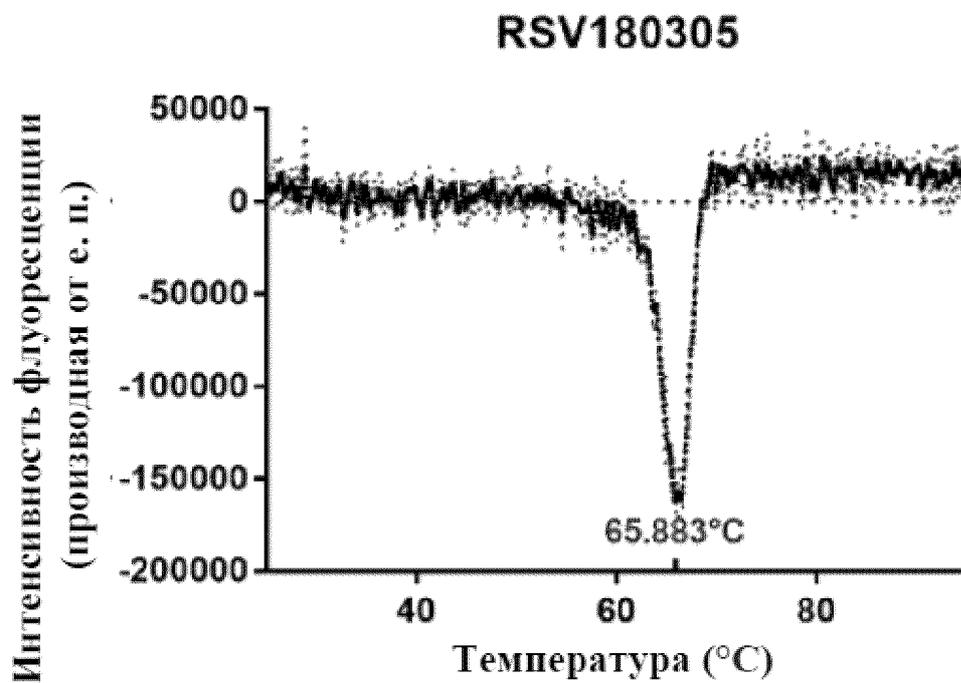
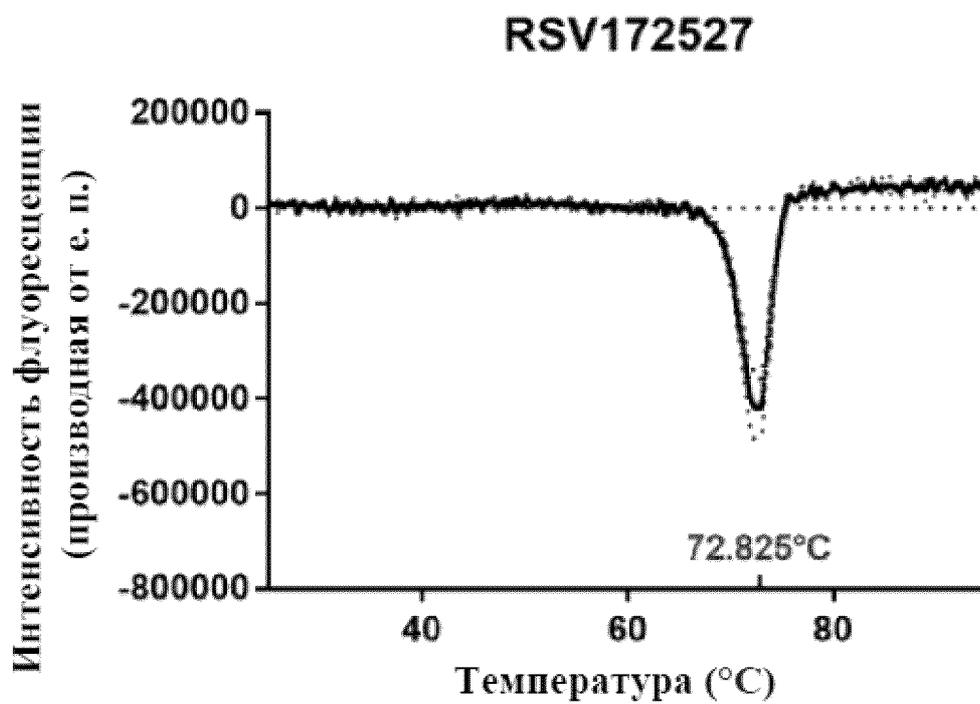
**Фиг. 6**



Фиг. 7



Фиг. 7 - продолжение

**A****B**

Фиг. 8