

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202191622 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.01.31

(22) Дата подачи заявки
2017.04.04

(51) Int. Cl. A61K 39/155 (2006.01)
C07K 14/115 (2006.01)
C12N 5/075 (2010.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)

(54) СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ РАСТВОРИМЫЕ F-БЕЛКИ RSV ДО СЛИЯНИЯ

(31) 16163810.1

(32) 2016.04.05

(33) EP

(62) 201892251; 2017.04.04

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

(72) Изобретатель:
Крауп Андерс, Лангедейк Йоханнес
Петрус Мария (NL)

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

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

202191622

A1

A1

202191622

СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ РАСТВОРИМЫЕ F-БЕЛКИ RSV ДО СЛИЯНИЯ

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

Предпосылки к созданию изобретения

Респираторно-синцитиальный вирус (RSV) является высококонтагиозным патогеном, вызывающим инфекции дыхательных путей у детей, который, как полагают, является причиной ~200000 летальных исходов среди детей ежегодно. У детей младше 2 лет на инфекции, вызванные RSV, приходится примерно 50% случаев госпитализации вследствие инфекций дыхательных путей, причем наибольшее количество случаев госпитализации имеет место в возрасте 2-4 месяца. Сообщалось, что почти все дети перенесут инфекцию, вызванную RSV, к возрасту двух лет, при этом повторное инфицирование на протяжении жизни связывают с пониженным врожденным иммунитетом. У пожилых людей тяжесть заболевания, вызванного RSV, является схожей с тяжестью заболеваний в результате инфекций, вызванных вирусом непандемического гриппа А.

Для инфицирования клетки-хозяина RSV, подобно другим оболочечным вирусам, таким как вирус гриппа и HIV, требуется слияние вирусной мембраны с мембраной клетки-хозяина. Что касается RSV, то консервативный белок слияния (F-белок RSV) сливает вирусную мембрану и клеточную мембрану клетки-хозяина. В современных моделях на основе исследований парамиксовирусов F-белок RSV изначально уложен в конформацию "до слияния". Метастабильная структура была выяснена лишь недавно в комплексе со стабилизирующим Fab-фрагментом нейтрализующего антитела (McLellan et al., Science 340 (6136):1113-7, 2013). Во время входа в клетку, конформация до слияния претерпевает рефолдинг и конформационные изменения по сравнению с ее конформацией "после слияния" (McLellan, J. Virol 85(15):7788-96, 2010; Swanson, PNAS 108(23):9619-24, 2011). Таким образом, F-белок RSV представляет собой метастабильный белок, который управляет слиянием мембран путем сочетания необратимого рефолдинга белка с соприкосновением мембран с помощью исходного фолдинга в метастабильную форму (конформация до слияния), которая в дальнейшем претерпевает дискретные/стадийные конформационные изменения до конформации с

более низкой энергией (конформация после слияния). Эти наблюдения позволяют предположить, что F-белок RSV до слияния и после слияния отличается в антигенном отношении (Calder, L. J. et al. *Virology* 271, 122-131 (2000)). Очевидно, исходя из электронной микроскопии RSV-F, что существуют значительные структурные различия между тримером F до слияния и после слияния, которые недавно были подтверждены с помощью кристаллографии (McLellan J.S. et al. *Science* 340(6136):1113-7 (2013) и McLellan J.S. et al. *Science* 342(6158): 592-8 (2013)), и было показано, что большинство нейтрализующих антител в сыворотке крови RSV-положительных индивидуумов связывают с F до слияния (Ngwuta et. al., *Science Translational Medicine*, 7(309): 309ra162, 1-9).

Вакцины против инфекции, вызванной RSV, в настоящее время не существует, хотя она и является очень востребованной. Кандидаты вакцин на основе F-белка RSV оказались неэффективными вследствие проблем, например, связанных со стабильностью, чистотой, воспроизводимостью и эффективностью. Как указывалось выше, кристаллические структуры выявили значительное конформационное изменение между состояниями до слияния и после слияния. Величина перестройки предполагала, что только часть антител, направленных на конформацию RSV-F после слияния, будет способна к перекрестной реакции с нативной конформацией шиповидного отростка до слияния на поверхности вируса. Соответственно, усилия для получения вакцины против RSV сосредоточивались на разработке вакцин, которые содержат формы F-белка RSV до слияния (см., например, WO 20101149745, WO 2010/1149743, WO 2009/1079796, WO 2012/158613). Однако, эти усилия не дали стабильных F-белков RSV до слияния, которые можно было бы использовать в качестве кандидатов для тестирования у людей.

Следовательно, сохраняется потребность в эффективных вакцинах и способах вакцинации против RSV, в частности предусматривающих F-белки RSV в конформации до слияния. Целями настоящего изобретения являются получение таких вакцин и способы вакцинации против RSV безопасным и эффективным способом.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение предусматривает стабильные рекомбинантные белки слияния (F) респираторного синцитиального вируса (RSV) до слияния, т. е. рекомбинантные F-белки RSV в

растворимой форме (т. е. не связанные с мембраной), которые являются стабилизированными в конформации до слияния, где F-белок RSV содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 или их фрагментов.

В некоторых вариантах осуществления F-белки RSV или их фрагменты содержат по меньшей мере один эпитоп, который является специфическим для F-белка в конформации до слияния, где по меньшей мере один эпитоп распознается моноклональным антителом, специфичным в отношении конформации до слияния, содержащим CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 4, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 5, CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6 и CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 7, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 8 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 9, и/или моноклональным антителом, специфичным в отношении конформации до слияния, содержащим CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 10, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 11, CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 12 и CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 13, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 14 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления F-белки RSV являются тримерными.

Настоящее изобретение также предусматривает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие F-белки RSV до слияния или их фрагменты в соответствии с настоящим изобретением и векторы, содержащие такие молекулы нуклеиновых кислот.

Настоящее изобретение также относится к композициям, предпочтительно иммуногенным композициям, содержащим указанный F-белок RSV до слияния (или его фрагменты), молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный F-белок RSV до слияния, а также к их применению в индуцировании иммунного ответа к F-белку RSV, в частности их применению в качестве вакцины. Настоящее изобретение также относится к способам индуцирования у субъекта иммунного ответа против респираторного синцитиального вируса (RSV), предусматривающим введение субъекту эффективного количества F-белка RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный F-белок RSV, и/или вектор, содержащий молекулу указанной нуклеиновой кислоты. Предпочтительно, индуцированный иммунный ответ характеризуется выработкой нейтрализующих антител к RSV и/или защитным иммунитетом против

RSV. В конкретных аспектах настоящее изобретение относится к способу индуцирования у субъекта выработки нейтрализующих 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 молекулу указанной нуклеиновой кислоты.

Краткое описание графических материалов

ФИГ. 1. Схематическое представление вариантов F-белка RSV. SCDM - одноцепочечный двойной мутант, SCTM - одноцепочечный тройной мутант, PRQM - преобразованный четверной мутант, и PRPM - преобразованный пента-мутант. Секретируемые белки представлены без сигнального пептида и фрагмента p27. Показаны домены F1 и F2, а также пептид слияния (FP), домен тримеризации фибритина (фолдон) и линкер в одноцепочечных белках между F2 и F1 (GSGSG). Три стабилизирующих мутации (N67I, S215P и D386N) (черные ромбы). Две мутации для улучшения антигенного соответствия циркулирующим штаммам (K66E и I76V) (серые ромбы). Положение остатка пронумеровано, как и полноразмерный белок дикого типа, в том числе сигнальный пептид.

ФИГ. 2. Уровни экспрессии белка и стабильность до слияния преобразованных вариантов PR-A2 F-белка RSV со множественными аминокислотными заменами. Уровни экспрессии белка в супернатантах клеточной культуры тестировали через 72 часа после трансфекции с помощью способа количественного октета (Q-Octet) с использованием CR9501 и CR9503 (полосы слева) и фракцией F-белка RSV, связывающегося со специфическим антителом CR9501 до слияния, в день сбора и после хранения при 4°C в течение указанного периода времени (полосы справа). Полосы представляют среднее значение от 2-4 измерений, линии представляют диапазон значений.

ФИГ. 3. Значения температуры плавления (Tm) очищенных F-белков RSV. Каждое измерение представлено точкой.

ФИГ. 4. Замены аминокислот K66E и I76V не оказывали эффекта в отношении уровней экспрессии F-белка и стабильности до слияния. Уровни экспрессии белка в супернатантах клеточной культуры тестировали через 96 часов после трансфекции с помощью способа Q-Octet с использованием CR9501 и CR9503 (полосы слева) и фракцией F-белка RSV, связывающегося со специфическим антителом CR9501 до слияния, в день сбора и после хранения при

4°C в течение указанного периода времени (полосы справа). Полосы представляют среднее значение от 2 измерений, линии представляют диапазон значений.

ФИГ. 5. Стабильность до слияния вариантов F-белка в супернатанте клеточной культуры CHO. Уровни экспрессии белков в супернатантах клеточной культуры тестировали через 96 часов после трансфекции с помощью способа Q-Octet с использованием CR9501 и CR9503 и фракцией F-белка RSV, связывающегося со специфическим антителом CR9501 до слияния, в день сбора и после хранения при 4°C в течение указанного периода времени. Полосы представляют среднее значение от 2 измерений, линии представляют диапазон значений. PRQM – PR-A2 с N67I, S215P, K66E и I76V; PRPM – PR-A2 с N67I, S215P, K66E, I76V и D486N.

ФИГ. 6. F-белки RSV по настоящему изобретению остаются инактными в супернатанте клеточной культуры CHO при pH 5. Значение pH супернатантов клеточной культуры, содержащих варианты F-белка, доводили до pH 5 и образцы инкубировали в течение 7 дней с ингибиторами протеазы или без них. Образцы анализировали на SDS-PAGE в восстанавливающих условиях. Первая полоса каждого геля представляет собой стандартный маркер молекулярной массы; указан размер стандартных белков. Образцы: 1 – образец в 0-й день; 2 – образец на 7-й день, инкубированный при 4°C; 3 – образец на 7-й день, инкубированный при 4°C с ингибиторами протеазы; 4 – образец на 0-й день; 5 – образец на 7-й день, инкубированный при комнатной температуре; 6 – образец на 7-й день, инкубированный при комнатной температуре с ингибиторами протеазы; 7 – образец на 0-й день; 8 – образец на 7-й день, инкубированный при 37°C; 9 – образец на 7-й день, инкубированный при 37°C с ингибиторами протеазы. В обработанных образцах белка нижняя полоса представляет домен F1, а верхняя полоса представляет частично обработанный белок (F1+p27) или необработанный белок (F1+F2). В образце одноцепочечного белка полоса представляет домены F1+F2. PRQM – PR-A2 с N67I, S215P, K66E и I76V; PRPM – PR-A2 с N67I, S215P, K66E, I76V и D486N. LNR: K683-065.

Фиг. 7. Термостабильность F-белков RSV в супернатанте клеточной культуры CHO. Образцы супернатантов подвергали термообработке в течение 30 мин. при значениях температуры 45–65°C. Количество белка до слияния в образце измеряли в ELISA с использованием антител CR9501. Значения нормализовали по

необработанному образцу (20°C). Кривые показаны для каждого белка отдельно, а также наложение всех кривых (в правом нижнем углу). Каждая точка представляет воспроизводимое измерение. Два анализа проводили в 2 технических повторах для каждого. Кривые подбирали с использованием уравнения нелинейной регрессии с переменным наклоном (GraphPad Prism); при этом значения температуры плавления (T_m) рассчитывали как значения IC50. PRQM – PR-A2 с N67I, S215P, K66E и I76V; PRPM – PR-A2 с N67I, S215P, K66E, I76V и D486N.

ФИГ. 8. Титры RSV в легких и носу через 5 дней после контрольного заражения с помощью A2 RSV. Титры RSV в легких (верхняя секция) и носу (нижняя секция) через 5 дней после контрольного заражения с помощью A2 RSV. Нижний уровень обнаружения (LOD) обозначен пунктирной линией. Средние титры ($\log_{10}$ БОЕ на грамм ткани) обозначены горизонтальными полосами. Адьювантные и неадьювантные группы PRPM сравнивали по дозе с помощью теста Кокрана-Мантеля-Хензеля, и статистические различия указаны на фигуре. i.m.: внутримышечный; i.n.: интраназальный.

ФИГ. 9. RSV-нейтрализующие титры против A Long RSV в сыворотке крови хлопковых крыс на 49-й день после примирования. RSV-нейтрализующие титры (IC50 ($\log_2$)) против A Long RSV с использованием считывания на основе ELISA определяли в сыворотке крови хлопковых крыс на 49-й день после примирования. Среднее значение для каждой группы обозначено горизонтальной полосой. Предел обнаружения (LOD) установлен на 3.0 ($\log_2$ и обозначен пунктирной линией). Титры VNA, индуцированные адьювантным и неадьювантным PRPM, сравнивали по дозе с помощью ANOVA, и результаты показаны на фигуре. i.m.: внутримышечный; i.n.: интраназальный.

Подробное описание изобретения

Белок слияния (F) респираторного синцитиального вируса (RSV) вовлечен в слияние вирусной мембраны с мембраной клетки-хозяина, которое требуется для инфицирования. mRNA F-белка RSV транслируется в белок-предшественник из 574 аминокислот, обозначенный F0, который содержит последовательность сигнального пептида из 26 аминокислот на N-конце, которая удаляется сигнальной пептидазой в эндоплазматическом ретикулуме. F0 расщепляется по двум сайтам (между аминокислотными остатками 109/110 и 136/137) с помощью клеточных фуринов-подобных протеаз в транс-Гольджи с удалением короткой гликозилированной вставочной

последовательности (также обозначенной как область p27, содержащая аминокислотные остатки 110-136) и образованием двух доменов или субъединиц, обозначенных F1 и F2. Домен F1 (аминокислотные остатки 137-574) содержит гидрофобный пептид слияния на своем N-конце, и C-конец содержит трансмембранную (ТМ) (аминокислотные остатки 530-550) и цитоплазматическую области (аминокислотные остатки 551-574). Домен F2 (аминокислотные остатки 27-109) ковалентно связан с F1 двумя дисульфидными мостиками. Гетеродимеры F1-F2 подвергаются сборке в вирионе в виде гомотримеров.

Вакцины против инфекции, вызванной RSV, в настоящее время не существует, хотя она и является очень востребованной. Одним потенциальным подходом к получению вакцины является субъединичная вакцина на основе очищенного F-белка RSV. Однако для данного подхода требуется, чтобы очищенный F-белок RSV находился в конформации, которая подобна конформации F-белка RSV в состоянии до слияния и которая стабильна в течение продолжительного периода и может быть получена в достаточных количествах. Кроме того, для вакцины на основе субъединицы необходимо осуществить усечение F-белка RSV путем делеции трансмембранной (ТМ) и цитоплазматической областей с получением растворимого секретируемого F-белка (sF). Поскольку область ТМ отвечает за заякоривание в мембране и тримеризацию, то незаякоренный растворимый F-белок является в значительной степени более лабильным, чем белок полной длины, и будет с легкостью подвергаться рефолдингу в конечное состояние после слияния. Для получения растворимого F-белка в стабильной конформации до слияния, который демонстрирует высокие уровни экспрессии и высокую стабильность, необходимо, таким образом, стабилизировать конформацию до слияния.

Несколько мутаций, стабилизирующих F-белок RSV в конформации до слияния, ранее были описаны в WO 2014/174018 и WO 2014/202570. F-белки RSV в соответствии с настоящим изобретением содержат уникальное и специфическое подмножество мутаций, описанных ранее в комбинации с двумя другими мутациями. В соответствии с настоящим изобретением было показано, что данная уникальная комбинация мутаций по настоящему изобретению приводит в результате к повышению уровней экспрессии F-белка RSV и стабильности конформации до слияния.

Настоящее изобретение, таким образом, предусматривает новые

стабильные растворимые F-белки RSV до слияния, т. е. растворимые F-белки RSV, которые являются стабилизированными в конформации до слияния, или их фрагменты. F-белки RSV в соответствии с настоящим изобретением содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3.

В исследовании, которое привело к настоящему изобретению, была введена уникальная комбинация мутаций вместе с гетерологичным доменом тримеризации для получения указанных стабильных растворимых F-белков RSV до слияния. Стабильные F-белки RSV до слияния по настоящему изобретению находятся в конформации до слияния, т. е. они содержат (имеют) по меньшей мере один эпитоп, который является специфическим для F-белка в конформации до слияния. Эпитоп, который является специфическим для F-белка в конформации до слияния, представляет собой эпитоп, который не представлен в конформации после слияния. Не желая ограничиваться 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 природных вирионах RSV, и таким образом может предоставлять преимущества для вызывания выработки защитных нейтрализующих антител.

В некоторых вариантах осуществления F-белки RSV до слияния (или их фрагменты) по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один эпитоп, который распознается моноклональным антителом, специфичным в отношении конформации до слияния, содержащим CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 4, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 5, CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6 и CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 7, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 8 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 9 (далее в данном документе называемым CR9501), и/или моноклональным антителом, специфичным в отношении конформации до слияния, содержащим CDR1-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 10, CDR2-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 11, CDR3-область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 12 и CDR1-область легкой цепи с SEQ ID NO: 13, CDR2-область легкой цепи с SEQ ID NO: 14 и CDR3-область легкой цепи с SEQ ID NO: 15 (называемым CR9502). CR9501 и CR9502 содержат переменные области тяжелой и легкой цепей и, таким образом, специфичности связывания антител 58C5 и 30D8 соответственно, которые, как было показано ранее, специфично

связываются с F-белком RSV в его конформации до слияния, а не в конформации после слияния (как раскрыто в WO 2012/006596).

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные F-белки RSV до слияния являются тримерными.

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

Как указано выше, настоящим изобретением также охватываются фрагменты F-белка RSV до слияния. Фрагмент может представлять собой результат какой-либо одной или обеих из amino-терминальной (например, путем отщепления сигнальной последовательности) и карбокси-терминальной делеций. 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 некоторых вариантах осуществления кодируемые белки в соответствии с настоящим изобретением содержат сигнальную последовательность, также называемую лидерной последовательностью или сигнальным пептидом, соответствующую аминокислотам 1-26 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. Сигнальные последовательности обычно являются короткими (например, 5-30 аминокислот в длину) аминокислотными последовательностями, присутствующими на N-конце большинства вновь синтезированных белков, которые предназначены для секреторного пути и обычно отщепляются сигнальной пептидазой с образованием свободного сигнального пептида и зрелого белка.

В некоторых вариантах осуществления белки в соответствии с настоящим изобретением не содержат сигнальную последовательность.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие F-белки RSV до слияния или их фрагменты, в соответствии с настоящим изобретением.

В предпочтительных вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие F-белки RSV в соответствии с настоящим изобретением, являются кодон-оптимизированными для экспрессии в клетках млекопитающих, предпочтительно клетках человека. Способы оптимизации кодонов известны и были описаны ранее (например, WO 96/09378). Последовательность считается

кодон-оптимизированной, если по меньшей мере один кодон, не являющийся предпочтительным, по сравнению с последовательностью дикого типа замещен кодоном, который является более предпочтительным. В данном документе кодон, не являющийся предпочтительным, представляет собой кодон, который используется в организме с меньшей частотой, чем другой кодон, кодирующий такую же аминокислоту, и кодон, являющийся более предпочтительным, представляет собой кодон, который используется в организме более часто, 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 кодон-оптимизированной 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 несколько различных полинуклеотидов и молекул нуклеиновой кислоты могут кодировать один и тот же белок в результате вырожденности генетического кода. Также понятно, что специалисты в данной области с помощью традиционных методик могут осуществлять нуклеотидные замены, которые не влияют на последовательность белка, кодируемую молекулами нуклеиновой кислоты, для отражения частоты использования кодонов в любом конкретном организме-хозяине, в котором белки будут экспрессироваться. Следовательно, если конкретно не указано иное, то выражение "нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность" включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности, которые кодируют белки и РНК, могут включать в себя или могут не включать в себя интроны.

Последовательности нуклеиновых кислот можно клонировать с помощью стандартных методик молекулярной биологии или получать *de novo* с помощью синтеза ДНК, который можно осуществлять с использованием стандартных процедур с участием компаний,

предоставляющих услуги в области синтеза ДНК и/или молекулярного клонирования (например, GeneArt, GenScripts, Invitrogen, Eurofins).

В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты содержат нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 21, 22 или 23.

Настоящее изобретение также предусматривает векторы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, которая описана 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 разрабатывать так, чтобы они были способны к репликации в прокариотических и/или эукариотических клетках. Кроме того, для трансформации эукариотических клеток можно использовать многие векторы, и при этом они будут интегрироваться целиком или частично в геном таких клеток, что приведет в результате к стабильным клеткам-хозяевам, содержащим в своем геноме требуемую нуклеиновую кислоту. Используемым вектором может быть любой вектор, который подходит для клонирования ДНК и который можно применять для транскрипции нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. Специалист в данной области способен выбрать подходящие векторы экспрессии и вставить последовательности нуклеиновых кислот по настоящему изобретению функциональным образом.

Клетки-хозяева, содержащие молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие F-белки RSV до слияния, также образуют часть настоящего изобретения. F-белки RSV до слияния можно получать с помощью технологии рекомбинантной ДНК, включающей экспрессию молекул в клетках-хозяевах, например клетках яичников китайского хомячка (CHO), линиях опухолевых клеток, клетках ВНК, клеточных линиях человека, таких как клетки HEK293, клетки PER.C6, или клетках дрожжей, грибов, насекомых и т. п. или трансгенных животных или растений. 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 млекопитающих. 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(-ы), 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 получать из разных источников, в том числе вирусов, прокариотических или эукариотических источников, или разрабатывать искусственным путем.

Среды для выращивания клеточных культур доступны от различных поставщиков, и подходящую среду можно в рабочем порядке выбрать для клетки-хозяина для экспрессии белка, представляющего интерес, в данном случае F-белков RSV до слияния. Подходящая среда может содержать или может не содержать сыворотку.

"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 обычно функционально связан с последовательностями, контролирующими экспрессию. Это можно осуществить, например, путем помещения нуклеиновой кислоты, кодирующей трансген(-ы), под контроль промотора. Можно добавлять дополнительные регуляторные последовательности. Для экспрессии трансгена(-ов) можно использовать многие промоторы, и они известны специалисту, например, такие промоторы могут включать промоторы вирусов, млекопитающих, синтетические промоторы и т. п. Неограничивающим примером подходящего промотора для получения экспрессии в эукариотических клетках является промотор гена CMV (US 5385839), например промотор предраннего гена CMV, например содержащий нуклеотиды 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(-ов). В качестве альтернативы, в данной области техники доступны несколько широко используемых векторов экспрессии, и их получают из коммерческих источников, например серия векторов pCDNA и pEF от Invitrogen, pMSCV и pTK-Hyg от BD Sciences, pCMV-Script от Stratagene и т. д., которые можно использовать для рекомбинантной экспрессии белка, представляющего интерес, или для получения подходящих промоторов и/или последовательностей терминаторов транскрипции, полиА-последовательностей и т. п.

Клеточная культура может представлять собой любой тип клеточной культуры, в том числе адгезивную клеточную культуру, например клетки, прикрепленные к поверхности культурального флакона или к микроносителям, а также суспензионную культуру. Манипуляции с суспензионными культурами в наиболее крупном масштабе проводят в периодическом процессе или процессе с подпиткой, поскольку они являются наиболее простыми для управления и масштабирования. В настоящее время непрерывные процессы на основе принципов перфузии становятся более распространенными, и они также являются подходящими. Подходящие питательные среды хорошо известны специалисту в данной области и могут, как правило, быть получены из коммерческих источников в больших количествах или произведены по заказу в соответствии со стандартными протоколами. Культивирование можно осуществлять, например, в чашках, роллер-флаконах или в биореакторах, с использованием периодических, подпитываемых, непрерывных систем 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. Настоящее изобретение также предусматривает композиции, содержащие F-белок RSV до слияния, имеющий эпитоп, который присутствует в конформации F-белка RSV до слияния, однако отсутствует в конформации после слияния, или его фрагмент. Настоящее изобретение также предусматривает композиции, содержащие

молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор, кодирующие такой F-белок RSV до слияния или его фрагмент. Композиции предпочтительно представляют собой иммуногенные композиции, содержащие F-белок RSV до слияния, и/или молекулу нуклеиновой кислоты, и/или вектор, которые описаны выше. Настоящее изобретение также предусматривает применение стабилизированного F-белка RSV до слияния или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный F-белок RSV в соответствии с настоящим изобретением, для индуцирования у субъекта иммунного ответа на F-белок RSV. 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. Также 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 использовать для предупреждения (профилактики) и/или лечения инфекций, вызванных RSV. В некоторых вариантах осуществления предупреждение и/или лечение может быть направлено на группы пациентов, которые восприимчивы к инфекции, вызываемой RSV. Такие группы пациентов включают без ограничения, например, пожилых (например, в возрасте ≥ 50 лет, в возрасте ≥ 60 лет и предпочтительно в возрасте ≥ 65 лет), молодых (например, в возрасте ≤ 5 лет, в возрасте ≤ 1 года), госпитализированных пациентов и пациентов, которые получали лечение противовирусным соединением, однако продемонстрировали неудовлетворительный противовирусный ответ.

F-белки RSV до слияния, молекулы нуклеиновых кислот и/или векторы в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы, например, в самостоятельном лечении и/или профилактике заболевания или состояния, вызываемого RSV, или в комбинации с другими профилактическими и/или терапевтическими средствами лечения, такими как (существующие или будущие) 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 нуклеиновых кислот 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 ингибирование или уменьшение распространения RSV или ингибирование или уменьшение проявления, развития или прогрессирования одного или нескольких симптомов, связанных с инфекцией, вызванной RSV. Облегчение, как используется в данном документе, может относиться к уменьшению видимых или ощутимых симптомов заболевания, виремии 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 вспомогательное вещество. В настоящем контексте термин "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель или вспомогательное вещество в используемых дозировках и концентрациях не вызовет каких-либо нежелательных или неблагоприятных эффектов у субъектов, которым их вводят. Такие фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные вещества 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. Novgaard, 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 ними контейнеры, предназначенные для лекарственных форм. Значение pH раствора обычно находится в диапазоне pH от 3,0 до 9,5, например pH от 5,0 до 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. Как известно из уровня техники, адъюванты дополнительно повышают иммунный ответ на применяемую антигенную детерминанту. 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 на основе масляных эмульсий (или композиции типа "масло в воде"), в том числе сквален-водных эмульсий, таких как MF59 (см., например, WO 90/14837); составы с сапонами, такие как, например, QS21 и иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS) (см., например, US 5057540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); производные бактерий или микроорганизмов, примерами которых являются монофосфорилилипид А (MPL), 3-О-деацилированный MPL (3dMPL), олигонуклеотиды, содержащие мотив CpG, ADP-рибозилирующие токсины бактерий или их мутантные формы, такие как термолабильный энтеротоксин LT *E. coli*, холерный токсин CT и т. п.; белки эукариотов (например, антитела или их фрагменты (например, направленные против самого антигена или CD1a, CD3, CD7, CD80) и лиганды к рецепторам (например, CD40L, GMCSF, GCSF и др.), 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, составляющих 0,05-5 мг, например 0,075-1,0 мг алюминия на дозу.

F-белки RSV перед слиянием можно также вводить в комбинацию или конъюгировать с наночастицами, такими как, например, полимеры, липосомы, виросомы, вирус-подобные частицы или самоорганизующиеся белковые 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 документе US 4235877. Конъюгирование с макромолекулами раскрыто, например, в документах US 4372945 или US 4474757.

В других вариантах осуществления композиции не содержат адъюванты.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение представляет способы получения вакцины против респираторного синцитиального вируса (RSV), предусматривающие обеспечение композиции в соответствии с настоящим изобретением и помещение ее в фармацевтически приемлемую композицию. Термин "вакцина" относится к средству или композиции, содержащим активный компонент, эффективный для индуцирования у субъекта определенной степени иммунитета к определенному патогенному или болезнетворному микроорганизму, которая приведет по меньшей мере к снижению (включительно до полного отсутствия) тяжести, продолжительности или другого проявления симптомов, связанных с инфицированием патогенным или болезнетворным микроорганизмом. 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, что вызывает формирование иммунного ответа в отношении F-белка RSV. Это обеспечивает способ предупреждения тяжелого заболевания нижних дыхательных путей, приводящего к госпитализации, и снижает частоту возникновения осложнений, таких как пневмония и бронхиолит, у субъекта вследствие инфицирования 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 вспомогательное вещество. Она может содержать или не содержать дополнительные активные ингредиенты. В некоторых вариантах осуществления она может

представлять собой комбинированную вакцину, которая дополнительно содержит другие компоненты, индуцирующие иммунный ответ, например против других белков RSV и/или против других инфекционных агентов. Введение дополнительных активных компонентов может быть осуществлено, например, путем отдельного введения или путем введения комбинации продуктов из вакцин по настоящему изобретению и дополнительных активных компонентов.

Композиции можно вводить субъекту, например субъекту-человеку. Суммарная доза F-белков RSV в композиции для однократного введения может составлять, например, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 10 мг, например 1 мкг - 1 мг, например 10 мкг - 100 мкг. Определение рекомендуемой дозы будет осуществляться в процессе эксперимента и является стандартным для специалистов в данной области.

Введение композиций в соответствии с настоящим изобретением может осуществляться с использованием стандартных путей введения. Неограничивающие варианты осуществления включают парентеральное введение, такое как внутрикожное, внутримышечное, подкожное, чрескожное введение или введение через слизистые, например интраназальное, пероральное и т. п. В одном варианте осуществления композицию вводят путем внутримышечной инъекции. Специалисту известны различные возможности введения композиции, например вакцины для индуцирования иммунного ответа к антигену(-ам), присутствующему(-им) в вакцине.

Как используется в данном документе, субъект 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. *Получение стабильных F-белков RSV до слияния*

Были получены несколько вариантов F-белка RSV до слияния, которые схематически представлены на фиг. 1. Все кандидаты включали домен тримеризации фибритина (фолдон) (GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL; SEQ ID NO: 20), связанный с аминокислотным остатком 495 домена F1 A2 RSV.

В преобразованных версиях F RSV (т. е. в версиях, которые расщеплены с удалением области p27) замена N67I оказала наиболее сильный эффект как в отношении уровня экспрессии, так и в отношении стабильности, однако полностью стабильный F-белок до слияния был получен лишь тогда, когда замены 67 и 215 были объединены, что привело к 20-кратному увеличению уровня экспрессии (фиг. 2). Добавление третьей замены аминокислоты не улучшало уровень экспрессии или стабильность, как измерено посредством стабильности при хранении при 4°C. Однако, в случае когда F-белки RSV были очищены и дополнительно охарактеризованы, оказалось, что дополнительная третья замена значительно стабилизировала F-белок до слияния, как измерено с помощью более жесткого теста на термостабильность (методом дифференциальной сканирующей флуориметрии – DSF) (фиг. 3).

Поскольку штамм A2, который использовался в качестве родительской последовательности для описанных ранее вариантов F-белка RSV (WO2014/174018 и WO2014/202570), представлял собой лабораторный штамм, адаптированный на уровне клеточной линии, который накопил две уникальные и редкие мутации в вершущке K66 и I76), было решено подвергнуть мутации эти два остатка в соответствии с природными клиническими изолятами (K66E, I76V).

Мутации K66E и I76V были включены в новую преобразованную конструкцию белка, чтобы сделать последовательность ближе к природным изолятам вируса. Замены K66E+I76V тестировали в выбранных стабилизированных вариантах, чтобы продемонстрировать то, что аминокислотные замены не оказывали отрицательного влияния на экспрессию или стабильность белка. Было показано, что белки были стабильны в супернатантах клеточной культуры более 2 недель. Какого-либо отрицательного влияния на уровень экспрессии F-белков не было, напротив, F-белок RSV с мутациями N67I, S215P, K66E и I76V экспрессировался на более высоком уровне, чем белок только с N67I и S215P (фиг. 4).

Преобразованные F-белки RSV с N67I, S215P, K66E и I76V (названные PRQM для преобразованного четверного мутанта) и с N67I, S215P, K66E, I76V и D486N (называемые PRPM для преобразованного пента-мутанта) были очищены и дополнительно охарактеризованы.

Скрининг стабилизирующих мутаций для F-белка RSV осуществляли в суспензионных клетках HEK (FreeStyle 293F). Эти клетки удобно использовать в исследовательской лаборатории, поскольку они адаптированы к протоколу простой трансфекции и экспрессируют белки на высоком уровне. Для крупномасштабного производства и продуцирования белка GMP клетки CHO часто являются предпочтительной клеточной линией. Следовательно, экспрессию и стабильность нескольких предпочтительных конструкций F-белка тестировали в суспензионных клетках CHO (FreeStyle CHO-S). Клетки CHO-S трудно трансфицировать, а следовательно ожидается, что общие уровни экспрессии будут ниже, чем в клетках HEK. Следовательно, во время анализа авторы данного изобретения сосредоточились на относительной экспрессии белков и их стабильности.

Для теста были выбраны пять преобразованных белков. Все 5 вариантов содержали замены K66E, I76V, N67I и S215P. Как описано выше, последние 2 необходимы для стабилизации белка в конформации до слияния; первые две были включены, чтобы приблизить последовательность к изолятам, встречающимся в природе (как описано в предыдущем разделе). Белки отличались дополнительными мутациями E161P, D486N и E487Q. Они были выбраны из-за высокого уровня экспрессии, стабильности при хранении и низкого влияния на антигенность. Все белки были экспрессированы в клетках CHO и характеризовались сопоставимой стабильностью при

хранении. F-белки RSV были стабильны в конформации до слияния при хранении в супернатантах клеточных культур в течение 2 недель при 4°C (фиг. 5). Также была протестирована стабильность F-белков RSV в супернатанте клеточной культуры CHO при pH 5. Как показано на фиг. 6, не было обнаружено какой-либо деградации после инкубации образцов белка в течение 7 дней при разных значениях температуры.

В заключение, F-белки RSV по настоящему изобретению экспрессировались в клетках CHO и были стабильны в супернатантах клеточных культур. Также тестировали термостабильность белка. Супернатанты клеточных культур подвергали термообработке и количество белка до слияния в образцах измеряли в ELISA с помощью антитела CR9501 (фиг. 7).

Вариант с D486N (белок PRPM) был наиболее устойчивым к температурному стрессу. Добавление мутации K498R, казалось, не имело каких-либо преимуществ по сравнению с белком с минимальным количеством модификации (PRQM). Варианты с мутацией E161P характеризовались наиболее высокими уровнями экспрессии (данные не показаны). Однако недостатком этой аминокислотной замены было то, что остаток 161 расположен на поверхности белка и на краю эпитопа для антитела CR9501.

В соответствии с настоящим изобретением было показано, что PRPM (F-белок RSV с доменом фолдон тримеризации фибритина и с мутациями N67I, S215P, K66E, I76V и D486N, SEQ ID NO: 1) и PRQM (F-белок RSV с доменом фолдон тримеризации фибритина и с N67I, S215P, K66E и I76V, SEQ ID NO: 2) в качестве преобразованного белка до слияния с минимальными необходимыми модификациями последовательности, а также вариант PRQM +S46G или PRPM +S46G, все стабилизированы в конформации до слияния и демонстрируют высокое значение Tm (таблица 1). Последние варианты с заменой S46G характеризовались значительно более высоким уровнем экспрессии.

Таблица 1.

ID белка	Стабильность при замораживании/размораживании	Tm (°C)
PRQM S46G	Стабильный в течение 3 циклов, агрегация после 5 циклов	56,2

PRPM S46G	Стабильный в течение 5 циклов	63,6
PRPM	Стабильный в течение 5 циклов	65,0

ПРИМЕР 2. Иммуногенность и защита, индуцированные PRPM с адъювантом и без него

Был проведен эксперимент по определению иммуногенной и профилактической эффективности рекомбинантного белка PRPM в присутствии или отсутствии адъюванта в гомологичной модели контрольного заражения A2 RSV хлопкового хомяка. Животных иммунизировали i.m. в 0-й и 28-й дни с помощью 2 доз PRPM (5 и 0,5 мкг), неадъювантного или адъювантного, со 100 мкг Adjuphos. Животных подвергали контрольному заражению на 49-й день с помощью 10^5 (БОЕ) A2 RSV. Животных умерщвляли через 5 дней после заражения, и титры измеряли в легких и носу.

Результаты

Иммунизация адъювантным PRPM вызвала полную защиту в легких и носу, за исключением 1 животного, у которого выявили прорыв в носу. У большей части животных, получавших 5 и 0,5 мкг неадъювантного PRPM, выявляли прорыв в легких и носах, а также была значительная разница между группами, получавшими адъювантный и неадъювантный белки (фигура 8). Адъювантный белок индуцировал значительно более высокие титры VNA по сравнению с неадъювантным белком на 49-й день после иммунизации (фигура 9).

Таблица 1. Последовательности антител

Антител ○	VH-домен	CDR1 VH	CDR2 VH	CDR3 VH
CR9501	Аминокислоты 1-125 из SEQ ID NO: 16	GASINSDNYWT (SEQ ID NO:4)	HISYTGNTYYT PSLKS (SEQ ID NO:5)	CGAYVLISNCG WFDS (SEQ ID NO:6)
CR9502	Аминокислоты 1-121 из SEQ ID NO:18	GFTFSGHTIA (SEQ ID NO:10)	WVSTNN GNTEYAQKIQQ (SEQ ID NO:11)	EWLVMGGFAFD H (SEQ ID NO:12)
Антител ○	VL-домен	CDR1 VL	CDR2 VL	CDR3 VL

CR9501	Аминокислоты 1-107 из SEQ ID NO: 17	QASQDISTYLN (SEQ ID NO: 7)	GASNLET (SEQ ID NO:8)	QQYQYLPYT (SEQ ID NO:9)
CR9502	Аминокислоты 1-110 из SEQ ID NO: 19	GANNIGSQNVH (SEQ ID NO:13)	DDRDRPS (SEQ ID NO:14)	QVWDSSRDQAV I (SEQ ID NO:15)

Последовательности

SEQ ID NO: 1: PRPM

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
ELSNIK**E**IKNGTDAK**V**KLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
KTNVTLSKKRKRFLGLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSV
LTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSI**P**NIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTPVSTYM
LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSGNGCDYVS
NKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPS**N**EFDASISQVNEKINQSLAFIR
KSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

SEQ ID NO: 2 PROM

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
ELSNIK**E**IKNGTDAK**V**KLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
KTNVTLSKKRKRFLGLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSV
LTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSI**P**NIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTPVSTYM
LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSGNGCDYVS
NKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIR
KSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

SEQ ID NO: 3 PRPM+S46G

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYL**G**ALRTGWYTSVITI
ELSNIK**E**IKNGTDAK**V**KLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAK
KTNVTLSKKRKRFLGLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNGVSV
LTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSI**P**NIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTPVSTYM
LTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSGNGCDYVS
NKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPS**N**EFDASISQVNEKINQSLAFIR
KSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

CR9501, тяжелая цепь (SEQ ID NO: 16):

QVQLVQSGPGLVKPSQTLALTCNVSGASINSDNYYWTWIRQRPGGGLEWIGHISYTGNT
YYTPSLKSRLSMSLETSQSQFSLRLTSVTAADSAVYFCAACGAYVLISNCWFDSWGQGTQVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

CR9501, легкая цепь (SEQ ID NO: 17):

EIVMTQSPSSLSASIGDRVTITCQASQDISTYLNWYQQKPGQAPRLLIYGASNLETGVP
SRFTGSGYGTDFSVTISSLPEDIATYYCQQYQYLPYTFAPGKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDE
QLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

CR9502 тяжелая цепь (SEQ ID NO:18):

EVQLLQSGAELKKPGASVKISCKTSGFTFSGHTIAWVRQAPGQGLEWMGWVSTNNGNTE
YAQKIQGRVTMTMDTSTSTVYME LRSLTSDDTAVYFCAREWLMGGFAFDHWGQGTLLTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC

CR9502, легкая цепь (SEQ ID NO: 19):

QSVLTQASSVSVAPGQTARITCGANNIGSQNVHWYQQKPGQAPVLVYDDRRDRPSGIPD
RFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSRDQAVIFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP
SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ
WKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTIAPTECS

Нуклеотидная последовательность, кодирующая PRPM (SEQ ID NO: 20):

ATGGAAGTCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGCCGTGACCTT
CTGCTTCGCCAGCGGCCAGAACATCACCAGGAATTCTACCAGAGCACCTGTAGCGCCGTGTCC
AAGGGCTACCTGAGCGCCCTGAGAACCGGCTGGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGAGCA
ACATCAAGGAAATCAAGTGCAACGGCACCGACGCCAAGGTCAAGCTGATCAAGCAGGAAGTGA
CAAGTACAAGAACGCCGTGACCGAGCTGCAGCTGCTGATGCAGAGCACCCCGCCACCAACAAC
CGGGCCAGACGCGAGCTGCCCCGGTTTCATGAACTACACCCTGAACAACGCCAAAAAGACCAACG
TGACCCTGAGCAAGAAGCGGAAGCGGCGGTTCTTGGGCTTCTGCTGGGCGTGGGCTCTGCCAT
TGCTAGCGGCGTGGCCGTGTCTAAGGTGCTGCACCTGGAAGGCGAAGTGAACAAGATCAAGAGC
GCCCTGCTGAGCACCAACAAGGCCGTGGTGTCCCTGAGCAACGGCGTGTCCGTGCTGACCAGCA
AGGTGCTGGATCTGAAGAACTACATCGACAAGCAGCTGCTGCCCATCGTGAACAAGCAGAGCTG
CAGCATCCCCAACATCGAGACAGTGATCGAGTTCCAGCAGAAGAACAACCGGCTGCTGGAAATC
ACCCGCGAGTTTCAGCGTGAACGCTGGCGTGACCACCCCGTGTCCACCTACATGCTGACCAACA
GCGAGCTGCTGAGCCTGATCAACGACATGCCCATCACCAACGACCAGAAAAAGCTGATGAGCAA
CAACGTGCAGATCGTGCAGCAGAGCTACTCCATCATGAGCATCATCAAAGAAGAGGTGCTG
GCCTACGTGGTGCAGCTGCCCCGTGACGGCGTGATCGACACCCCTGCTGGAAGCTGCACACCA
GCCCCCTGTGCACCACCAACACCAAGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACCCGGACCGACCGGGG
CTGGTACTGCGATAATGCCGGCTCCGTGTCTTCTTTCCACAGGCCGAGACATGCAAGGTGCAG
AGCAACCGGGTGTCTGCGACACCATGAACAGCCTGACCCTGCCCTCCGAAGTGAACCTGTGCA
ACGTGGACATCTTCAACCCTAAGTACGACTGCAAGATCATGACCAGCAAGACCGACGTGTCCAG

CTCCGTGATCACCTCCCTGGGCGCCATCGTGTCTGCTACGGCAAGACCAAGTGCACCGCCAGC
 AACAGAACCAGGGGCATCATCAAGACCTTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGTCCAACAAGGGGG
 TGGACACCGTGTCCGTGGGCAACACCCTGTACTACGTGAACAAACAGGAAGGCAAGAGCCTGTA
 CGTGAAGGGCGAGCCCATCATCAACTTCTACGACCCCCTGGTGTTCCTCCAGCAACGAGTTCGAC
 GCCAGCATCAGCCAGGTCAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCTTCATCAGAAAGAGCGACG
 AGCTGCTGTCCGCCATCGGCGGCTACATCCCCGAGGCCCTAGAGATGGCCAGGCCTACGTGCG
 GAAGGACGGCGAGTGGGTGCTGCTGTCTACCTTCCTG

Нуклеотидная последовательность, кодирующая PRQM (SEQ ID NO: 21):

ATGGAAGTGTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGCCGTGACCTT
 CTGCTTCGCCAGCGGCCAGAACATCACCAGGAATTCTACCAGAGCACCTGTAGCGCCGTGTCC
 AAGGGCTACCTGAGCGCCCTGAGAACCGGCTGGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGAGCA
 ACATCAAGGAAATCAAGTGCAACGGCACCGACGCCAAGGTCAAGCTGATCAAGCAGGAACTGGA
 CAAGTACAAGAACGCCGTGACCGAGCTGCAGCTGCTGATGCAGAGCACCCCCGCCACCAACAAC
 CGGGCCAGACGCGAGCTGCCCCGGTTTCATGAACTACACCCTGAACAACGCCAAAAAGACCAACG
 TGACCCTGAGCAAGAAGCGGAAGCGGCGGTTTCCTGGGCTTCCTGCTGGGCGTGGGCTCTGCCAT
 TGCTAGCGGCGTGGCCGTGTCTAAGGTGCTGCACCTGGAAGGCGAAGTGAACAAGATCAAGAGC
 GCCCTGCTGAGCACCAACAAGGCCGTGGTGTCCCTGAGCAACGGCGTGTCCGTGCTGACCAGCA
 AGGTGCTGGATCTGAAGAACTACATCGACAAGCAGCTGCTGCCCATCGTGAACAAGCAGAGCTG
 CAGCATCCCCAACATCGAGACAGTGATCGAGTTCAGCAGAAGAACAACCGGCTGCTGGAAATC
 ACCCGCGAGTTCAGCGTGAACGCTGGCGTGACCACCCCGTGTCCACCTACATGCTGACCAACA
 GCGAGCTGCTGAGCCTGATCAACGACATGCCCATCACCAACGACCAGAAAAAGCTGATGAGCAA
 CAACGTGCAGATCGTGCAGCAGAGCTACTCCATCATGAGCATCATCAAAGAAGAGGTGCTG
 GCCTACGTGGTGCAGCTGCCCCGTGACGGCGTGATCGACACCCCTGCTGGAAGCTGCACACCA
 GCCCCCTGTGCACCACCAACACCAAGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACCCGGACCGACCGGGG
 CTGGTACTGCGATAATGCCGGCTCCGTGTCTCTTTCCACAGGCCGAGACATGCAAGGTGCAG
 AGCAACCGGGTGTCTGCGACACCATGAACAGCCTGACCCTGCCCTCCGAAGTGAACCTGTGCA
 ACGTGGACATCTTCAACCCTAAGTACGACTGCAAGATCATGACCAGCAAGACCGACGTGTCCAG
 CTCCGTGATCACCTCCCTGGGCGCCATCGTGTCTGCTACGGCAAGACCAAGTGCACCGCCAGC
 AACAGAACCAGGGGCATCATCAAGACCTTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGTCCAACAAGGGGG
 TGGACACCGTGTCCGTGGGCAACACCCTGTACTACGTGAACAAACAGGAAGGCAAGAGCCTGTA
 CGTGAAGGGCGAGCCCATCATCAACTTCTACGACCCCCTGGTGTTCCTCCAGCGACGAGTTCGAC
 GCCAGCATCAGCCAGGTCAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCTTCATCAGAAAGAGCGACG
 AGCTGCTGTCCGCCATCGGCGGCTACATCCCCGAGGCCCTAGAGATGGCCAGGCCTACGTGCG
 GAAGGACGGCGAGTGGGTGCTGCTGTCTACCTTCCTG

Нуклеотидная последовательность, кодирующая PRPM+S46G (SEQ ID NO: 22):

ATGGAAGTGTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGCCGTGACCTT
 CTGCTTTGCCAGCGGCCAGAACATCACCAGGAATTCTACCAGAGCACCTGTAGCGCCGTGTCC
 AAGGGCTATCTGGGCGCCCTGAGAACCGGCTGGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGAGCA

ACATCAAAGAAATCAAGTGCAACGGCACCGACGCCAAAGTGAAGCTGATCAAGCAGGAACTGGA
CAAGTACAAGAATGCCGTGACCGAACTGCAGCTGCTGATGCAGAGCACCCCCGCCACCAACAAC
CGGGCCAGAAGAGAACTGCCCAGATTTCATGAACTACACCCTGAACAACGCCAAAAAGACCAACG
TGACCCTGAGCAAGAAGCGGAAGCGGCGGTTTCCTGGGCTTTCTGCTGGGAGTGGGAAGCGCCAT
TGCTAGCGGAGTGGCCGTGTCTAAGGTGCTGCACCTGGAAGGCGAAGTGAACAAGATCAAGAGC
GCCCTGCTGAGCACCAACAAGGCCGTGGTGTCTCTGAGCAACGGCGTGTCCGTGCTGACCAGCA
AGGTGCTGGATCTGAAGAACTACATCGACAAACAGCTGCTGCCCATCGTGAACAAGCAGAGCTG
CAGCATCCCCAACATCGAGACAGTGATCGAGTTCCAGCAGAAGAACAACCGGCTGCTGGAAATC
ACCCGCGAGTTTCAGCGTGAACGCTGGCGTGACCACCCCGTGTCCACCTACATGCTGACCAACA
GCGAGCTGCTGTCCCTGATCAACGACATGCCCATCACCAACGACCAGAAAAAGCTGATGAGCAA
CAACGTGCAGATCGTGC GG CAGCAGAGCTACTCCATCATGAGCATTATCAAAGAAGAGGTGCTG
GCCTACGTGGTGCAGCTGCCTCTGTACGGCGTGATCGACACCCCTGCTGGAAGCTGCACACCA
GCCCTCTGTGCACCACCAACACCAAGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACCCGGACCGACAGAGG
CTGGTACTGCGATAATGCCGGCTCCGTCTCATTCTTTCCACAAGCCGAGACATGCAAGGTGCAG
AGCAACCGGGTGTTCTGCGACACCATGAACAGCCTGACCCTGCCCTCCGAAGTGAATCTGTGCA
ACGTGGACATCTTCAACCCTAAGTACGACTGCAAGATCATGACCTCCAAGACCGACGTGTCCAG
CTCCGTGATCACAAGCCTGGGCGCCATCGTGTCTCTGCTACGGCAAGACCAAGTGCACCGCCAGC
AACAAGAACCGGGGCATCATCAAGACCTTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGTCCAACAAGGGGG
TGGACACCGTGTCTGTGGGCAACACCCTGTACTACGTGAACAAACAGGAAGGCAAGAGCCTGTA
CGTGAAGGGCGAGCCCATCATCAACTTCTACGACCCCTGGTGTTCCTCCAGCAACGAGTTTCGAC
GCCAGCATCAGCCAAGTGAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCTTCATCAGAAAGTCCGATG
AGCTGCTGAGCGCCATCGGCGGCTACATCCCTGAGGCCCCCTAGAGATGGCCAGGCCTATGTGCG
GAAGGACGGCGAATGGGTGCTGCTGTCTACCTTTCTG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение рекомбинантного белка слияния (F) респираторного синцитиального вируса (RSV) до слияния, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, который был преобразован удалением сигнального пептида (аминокислоты 1-26) и области p27 (аминокислоты 110-136) SEQ ID NO: 1, для профилактики инфекции, вызванной RSV.

2. Применение рекомбинантного белка слияния (F) респираторного синцитиального вируса (RSV) до слияния, кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 2, для профилактики инфекции, вызванной RSV.

3. Применение по п. 2, где молекула нуклеиновой кислоты была кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих.

4. Клетка яичника китайского хомячка (CHO), содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок слияния (F) респираторного синцитиального вируса (RSV) до слияния, где рекомбинантный белок слияния (F) респираторного синцитиального вируса (RSV) до слияния содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

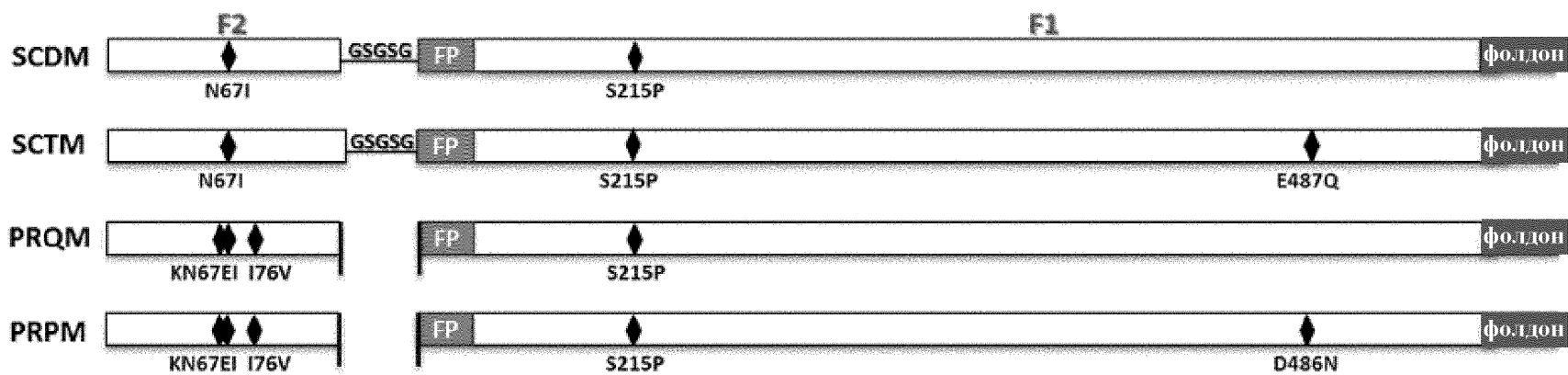
5. Клетка CHO по п. 4, где молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20.

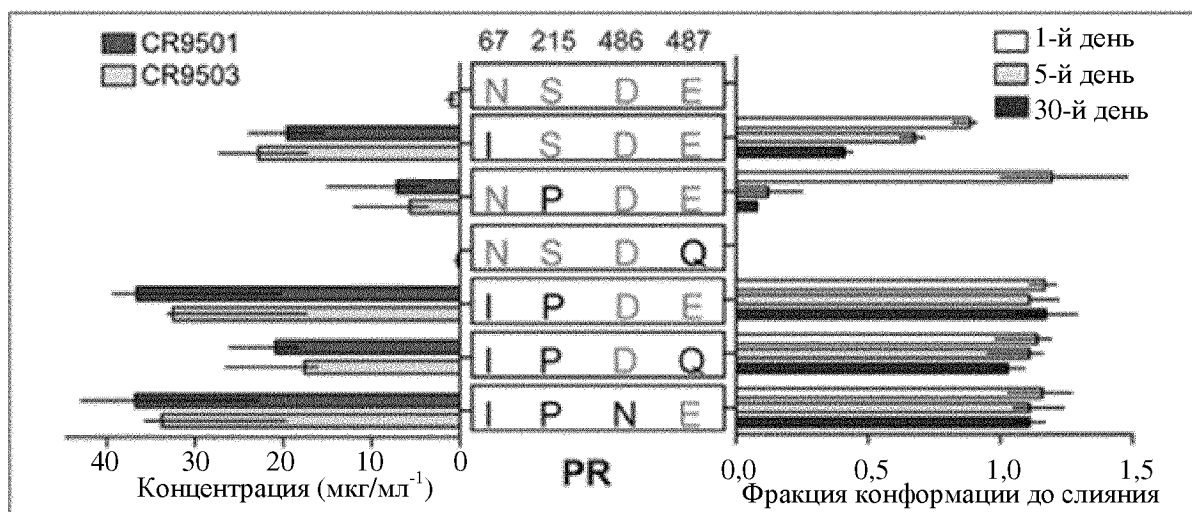
6. Клетка CHO по п. 5, где молекула нуклеиновой кислоты была кодон-оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих.

7. Рекомбинантный белок слияния (F) респираторного синцитиального вируса (RSV) до слияния, экспрессируемый клеткой CHO по любому из пп. 4-6.

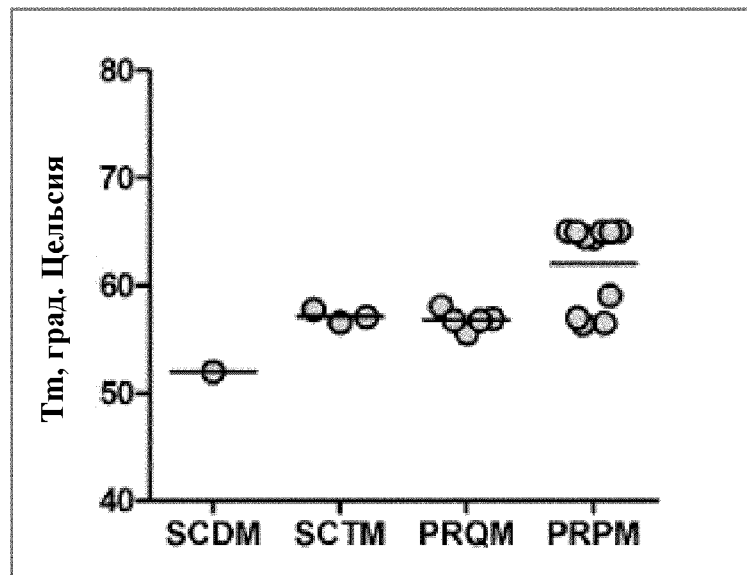
По доверенности

Фиг. 1

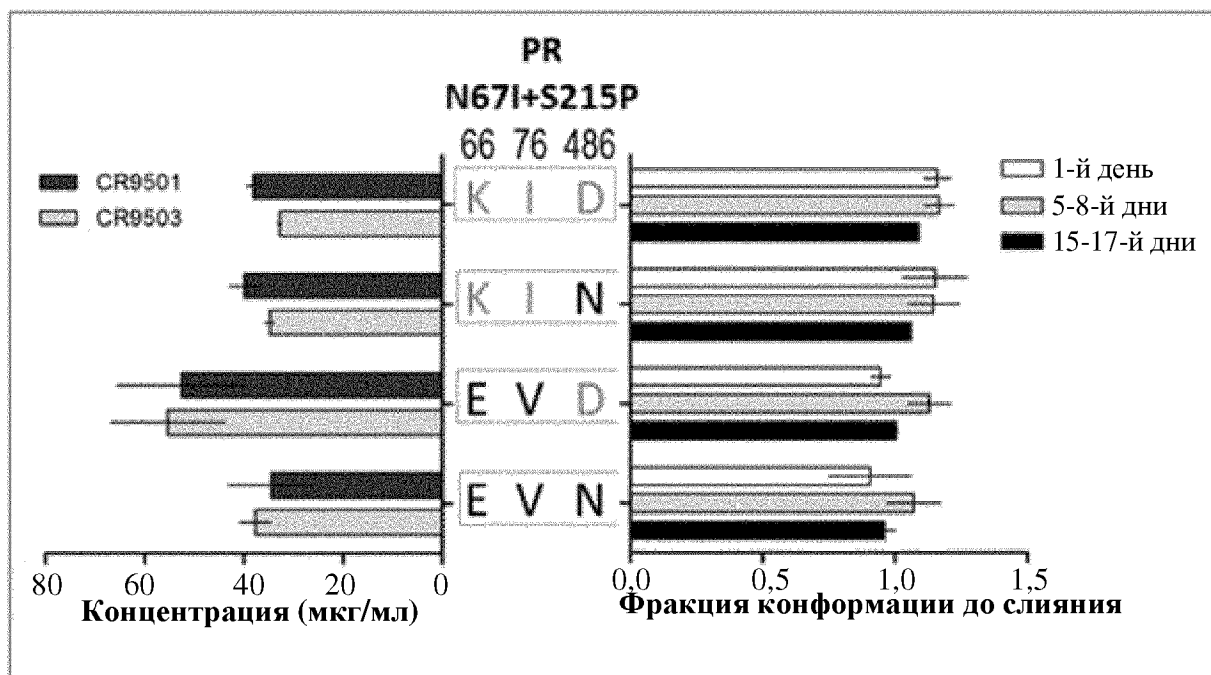




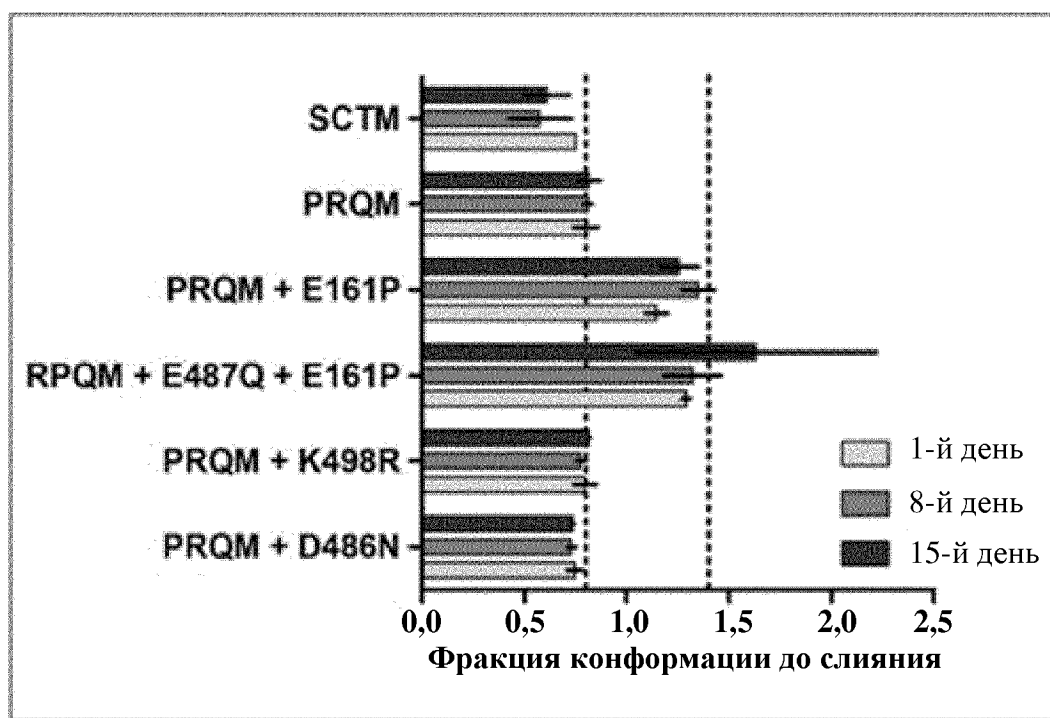
Фиг. 2



Фиг. 3

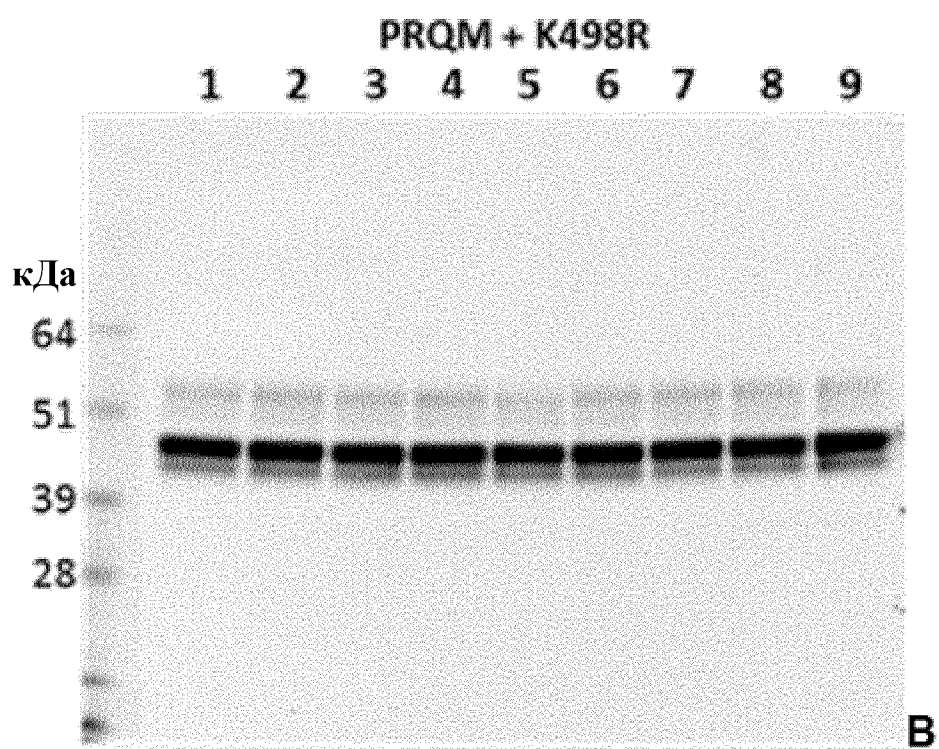
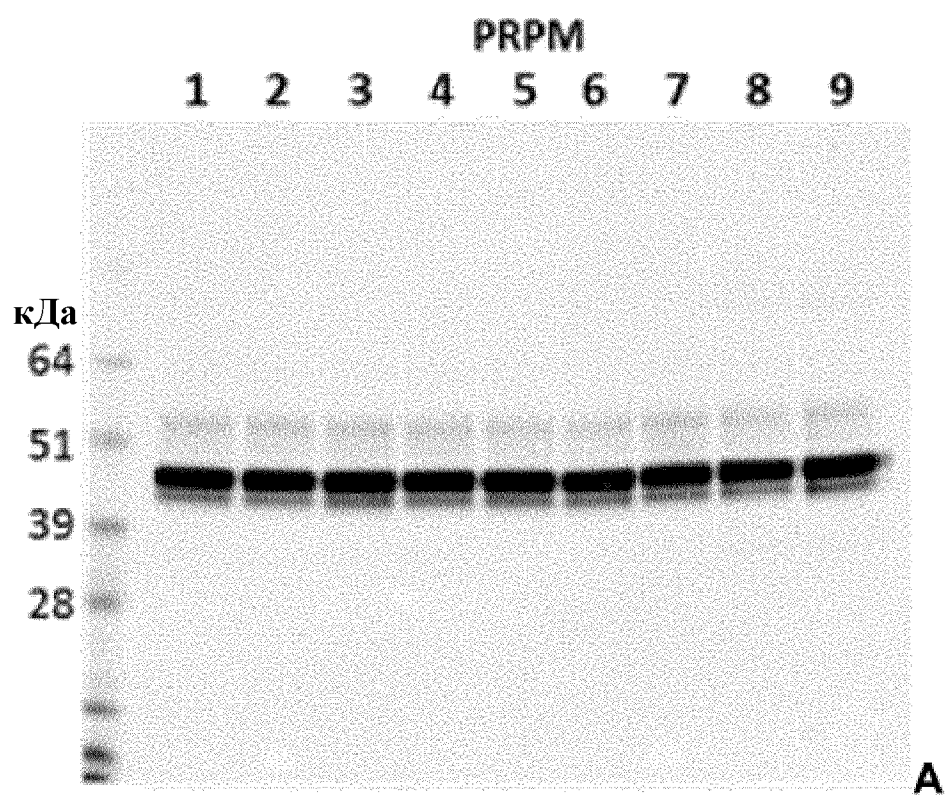


Фиг. 4

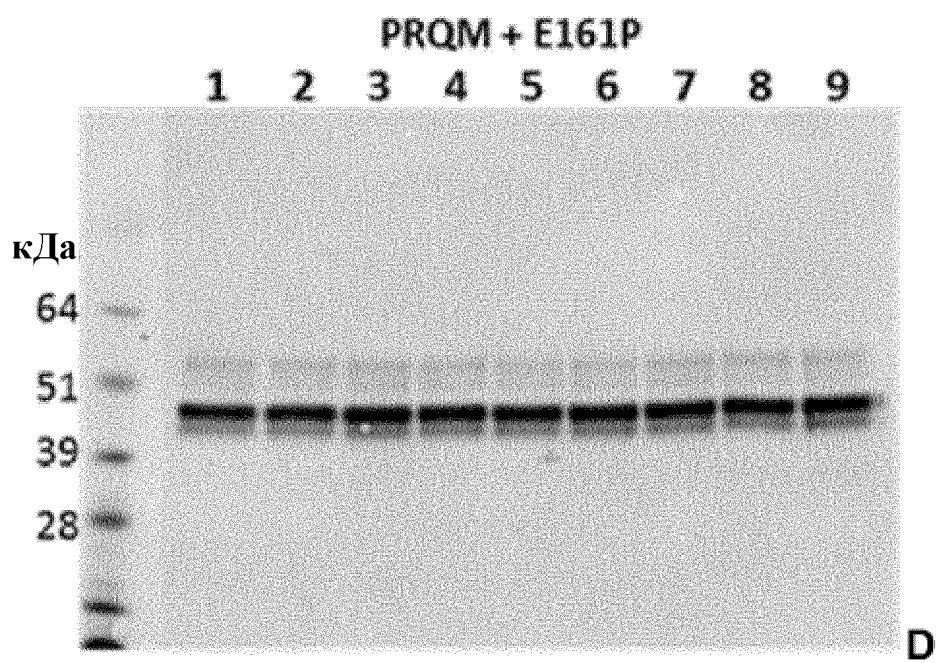
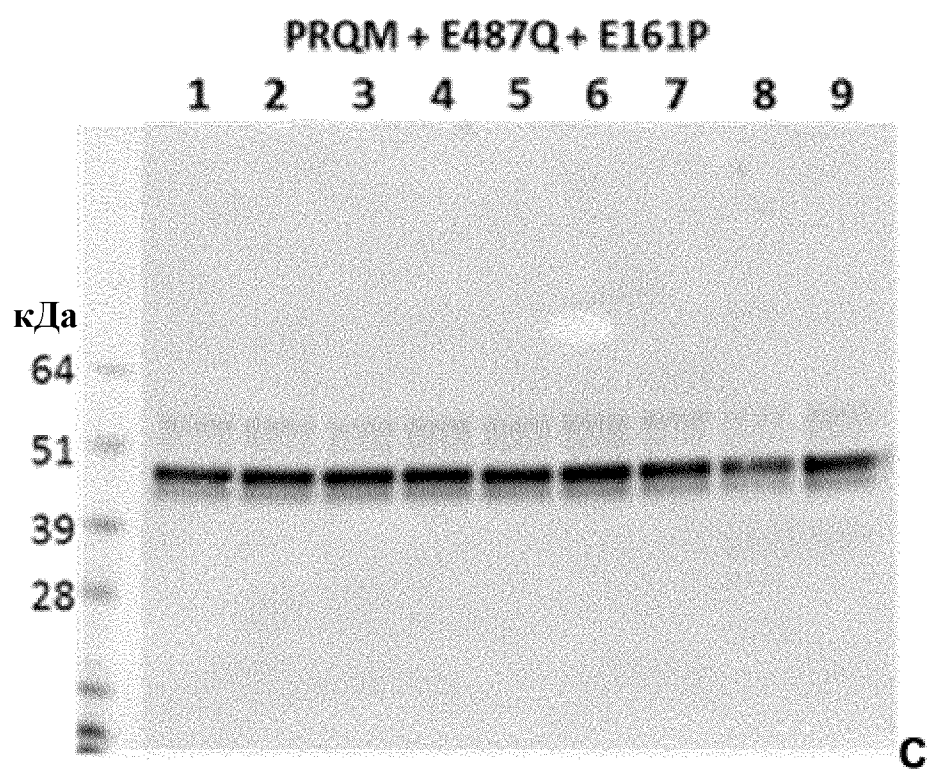


Фиг. 5

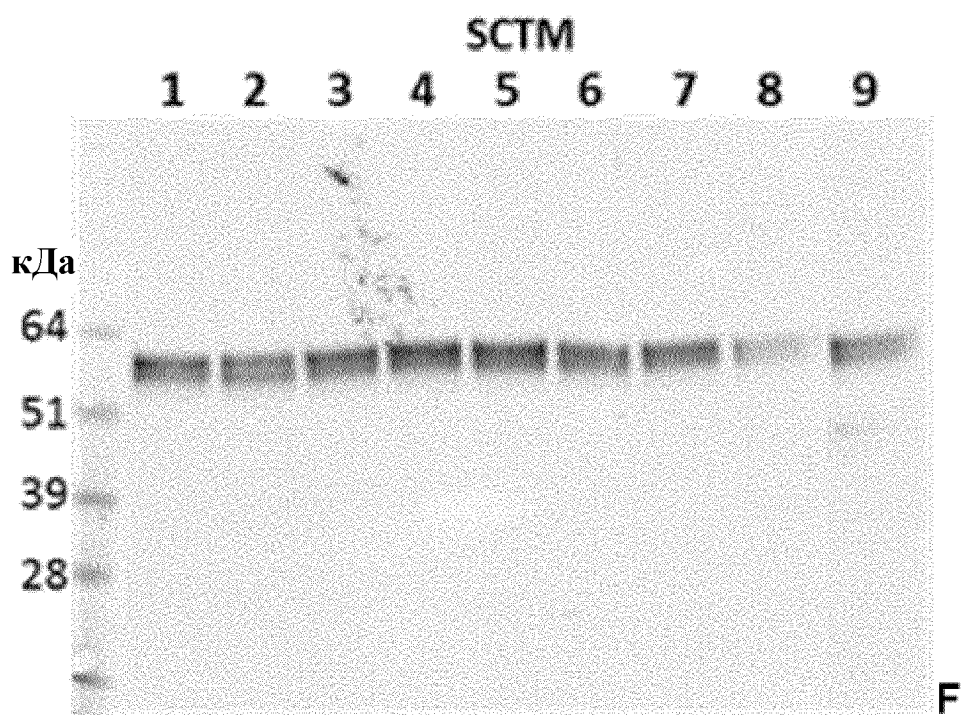
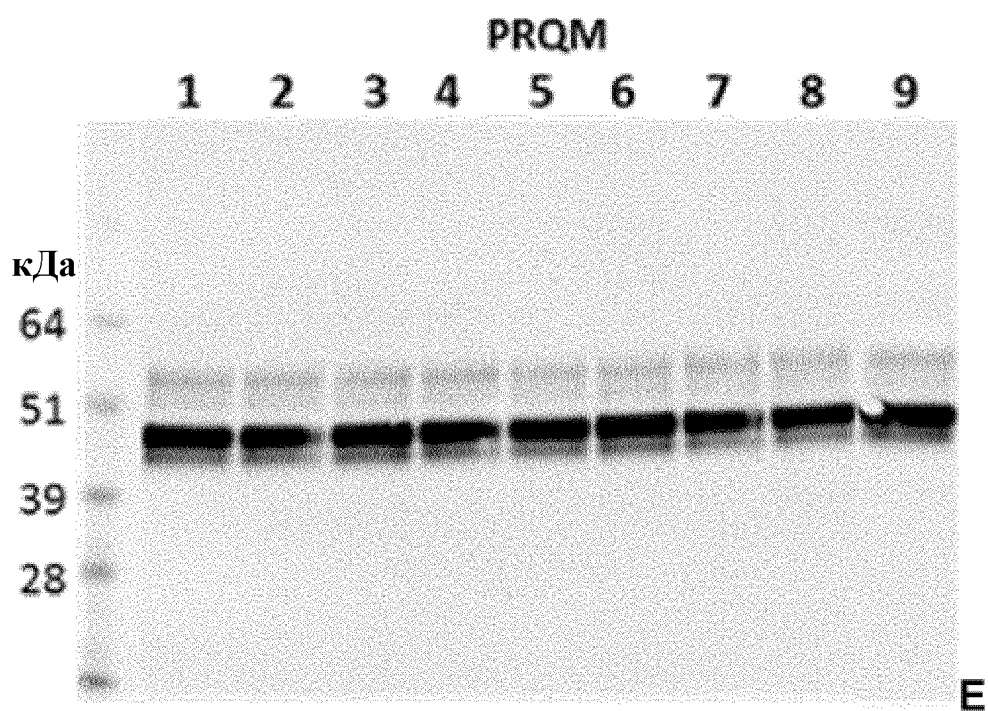
6/14



Фиг. 6

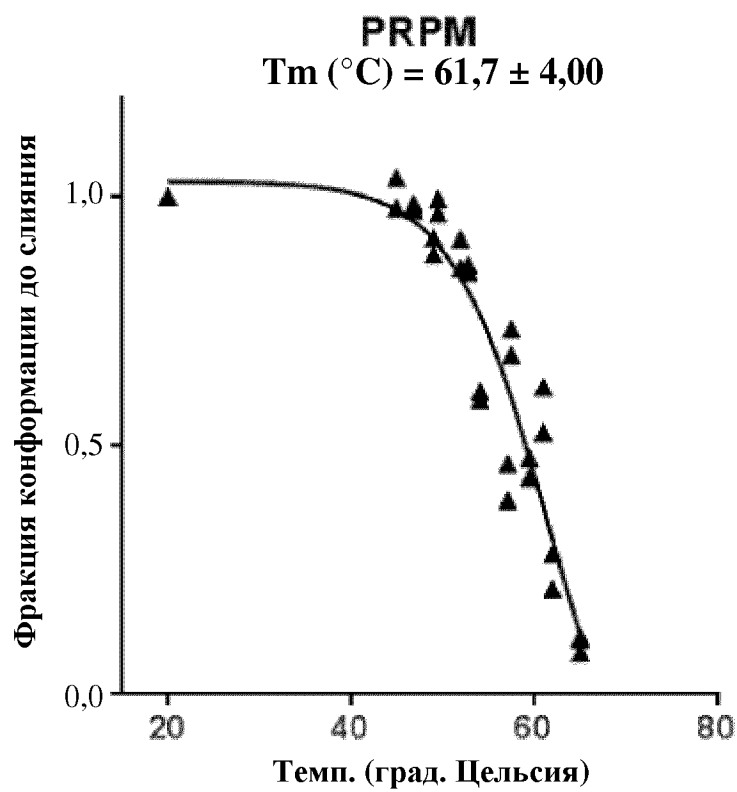


Фиг. 6 – продолжение

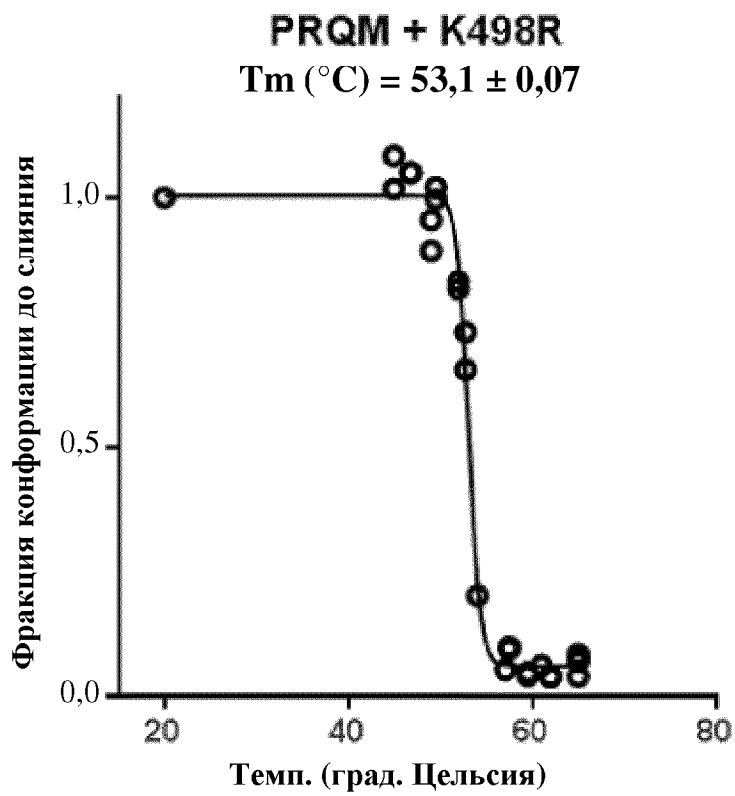


Фиг. 6 – продолжение

9/14



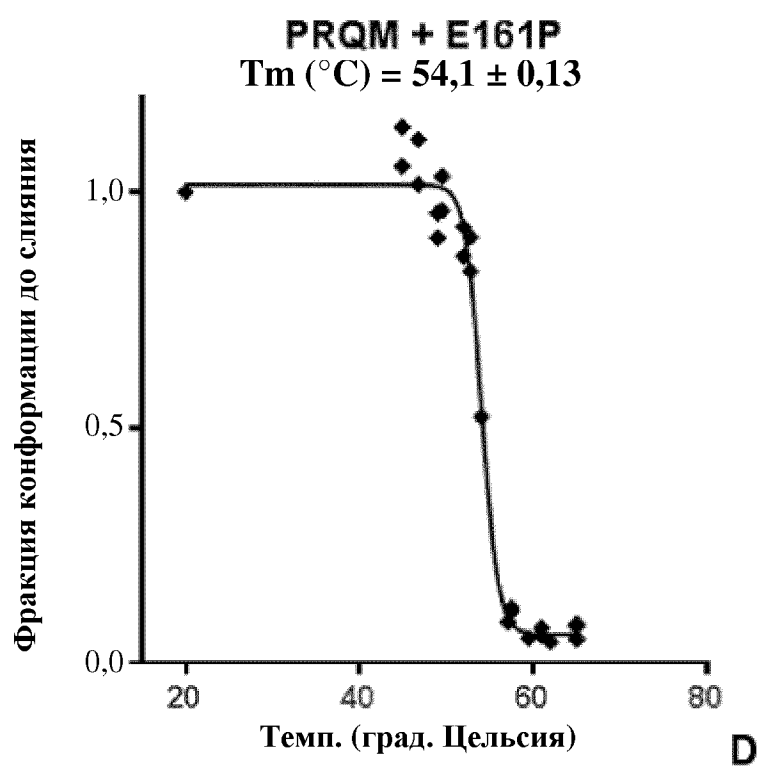
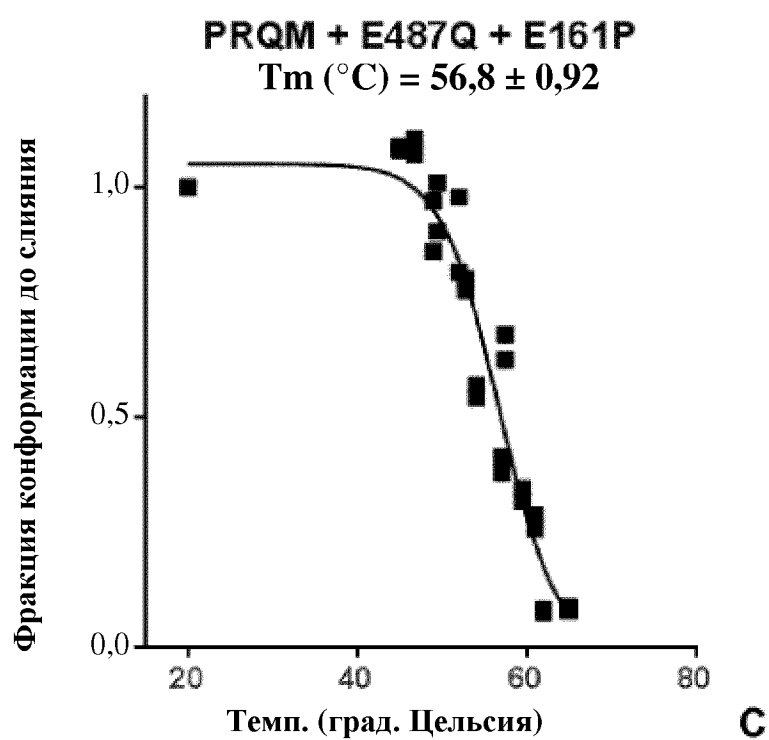
A



B

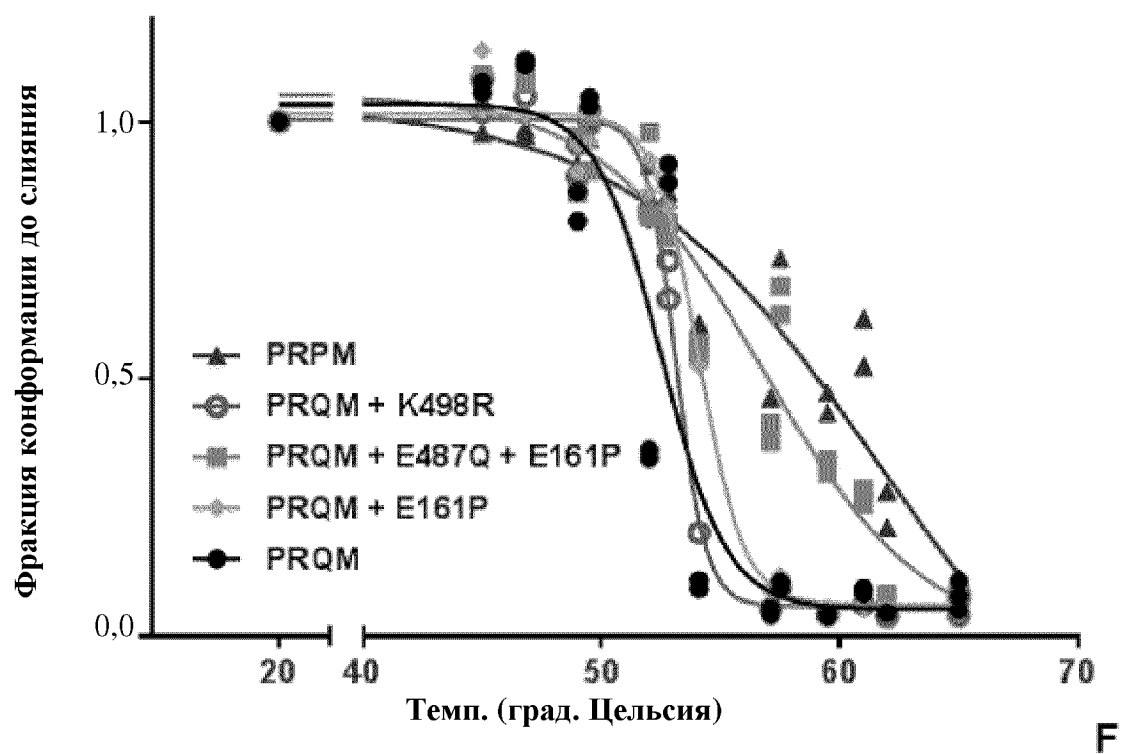
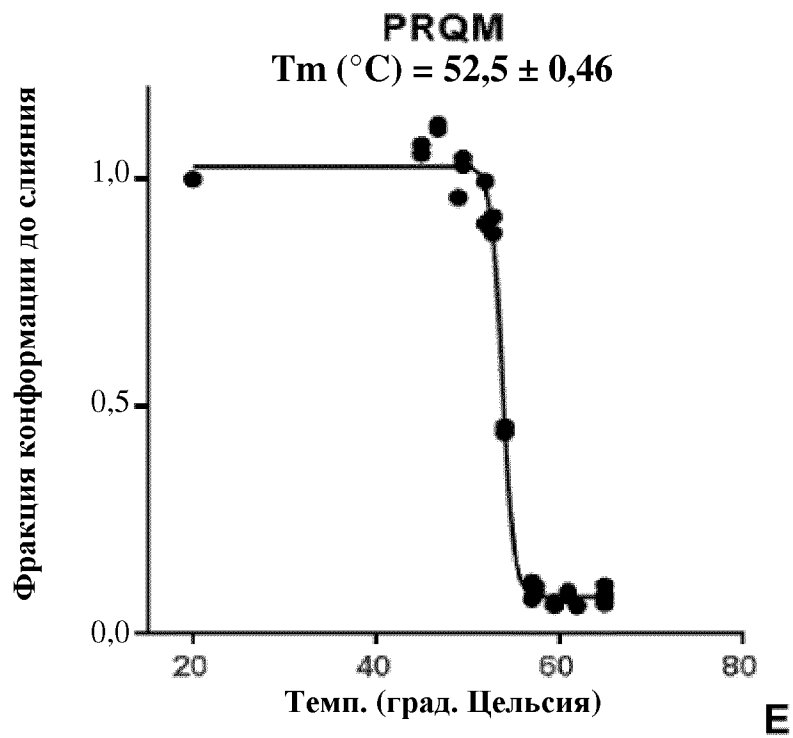
Фиг. 7

10/14

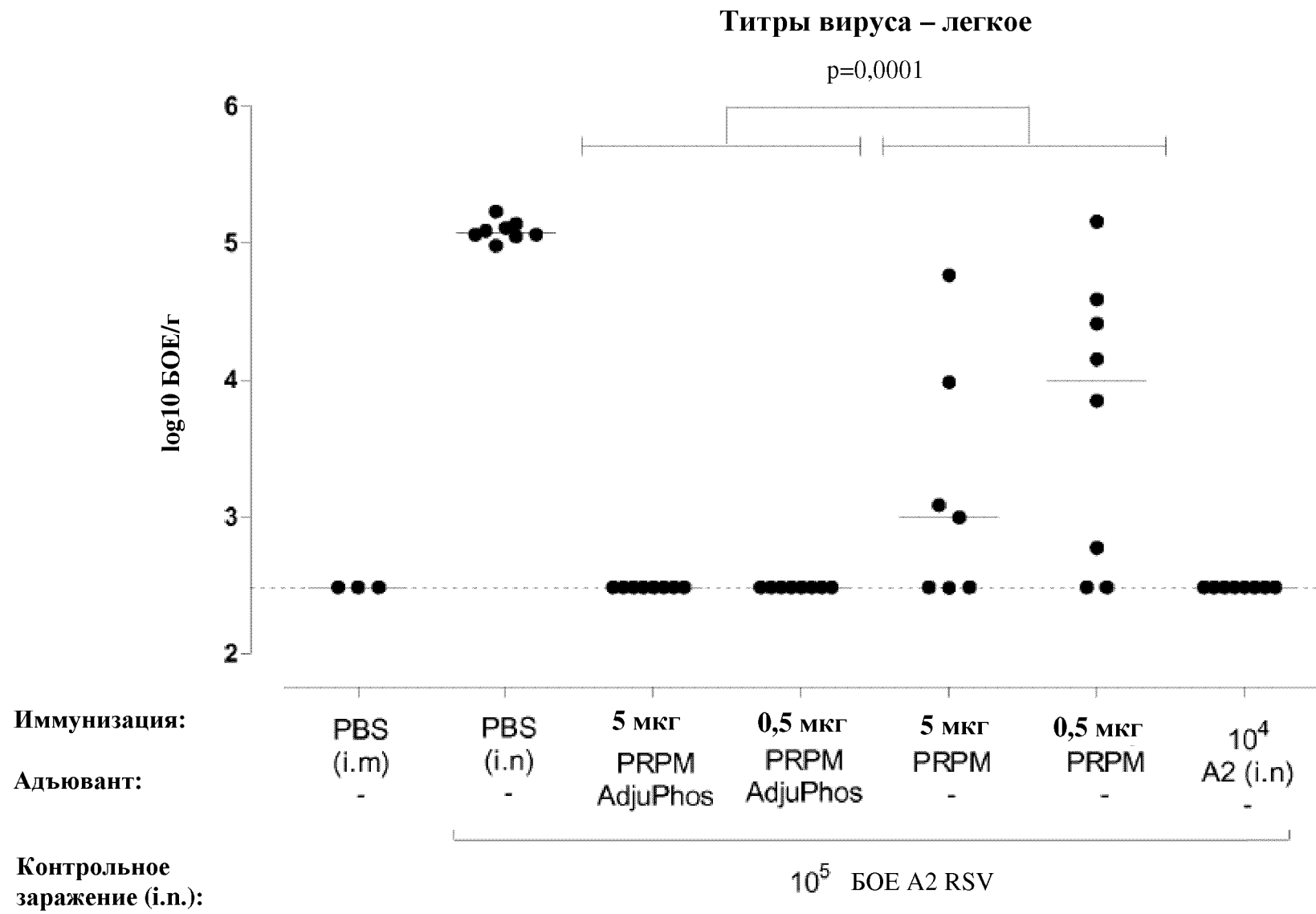


Фиг. 7 – продолжение

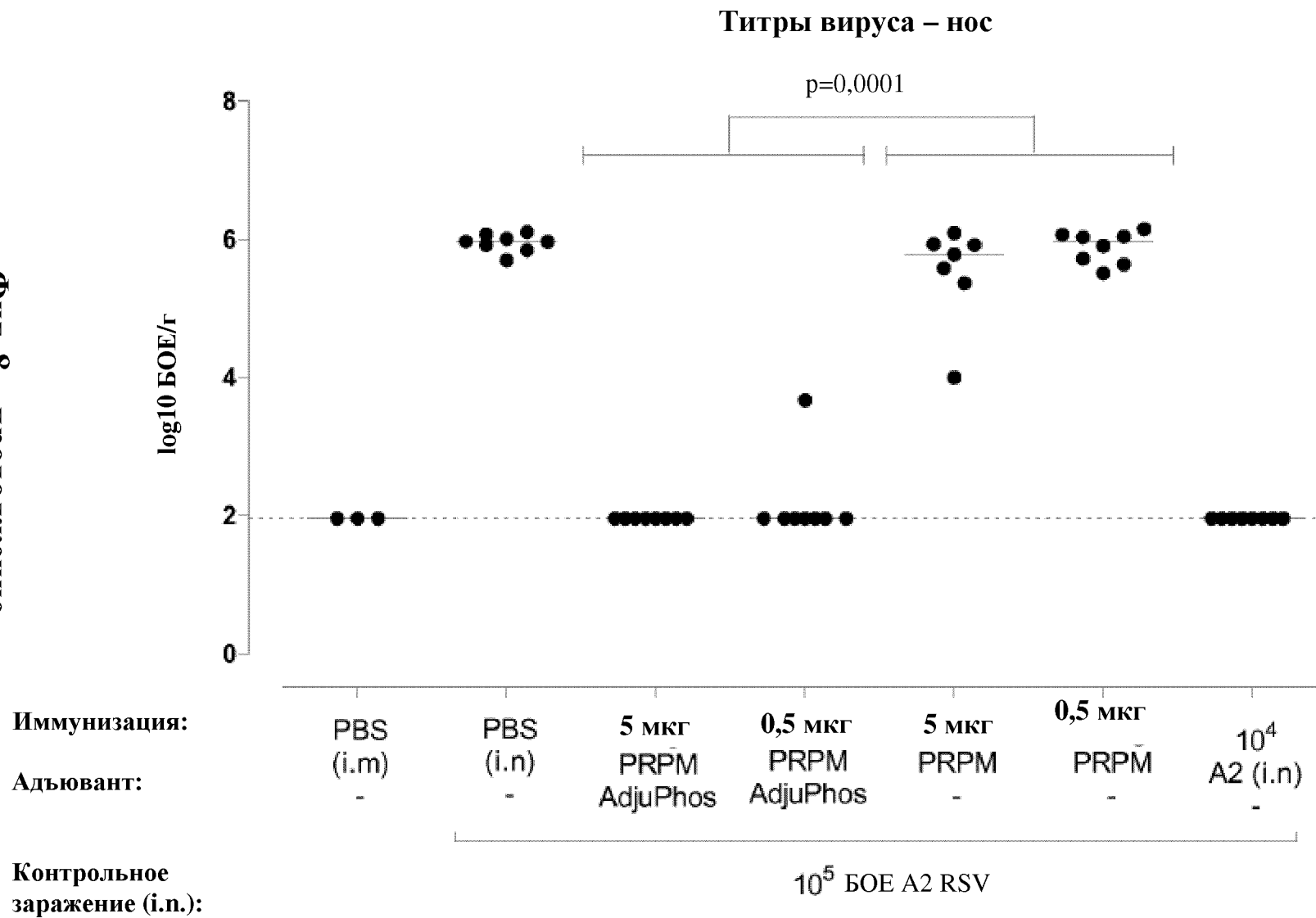
11/14



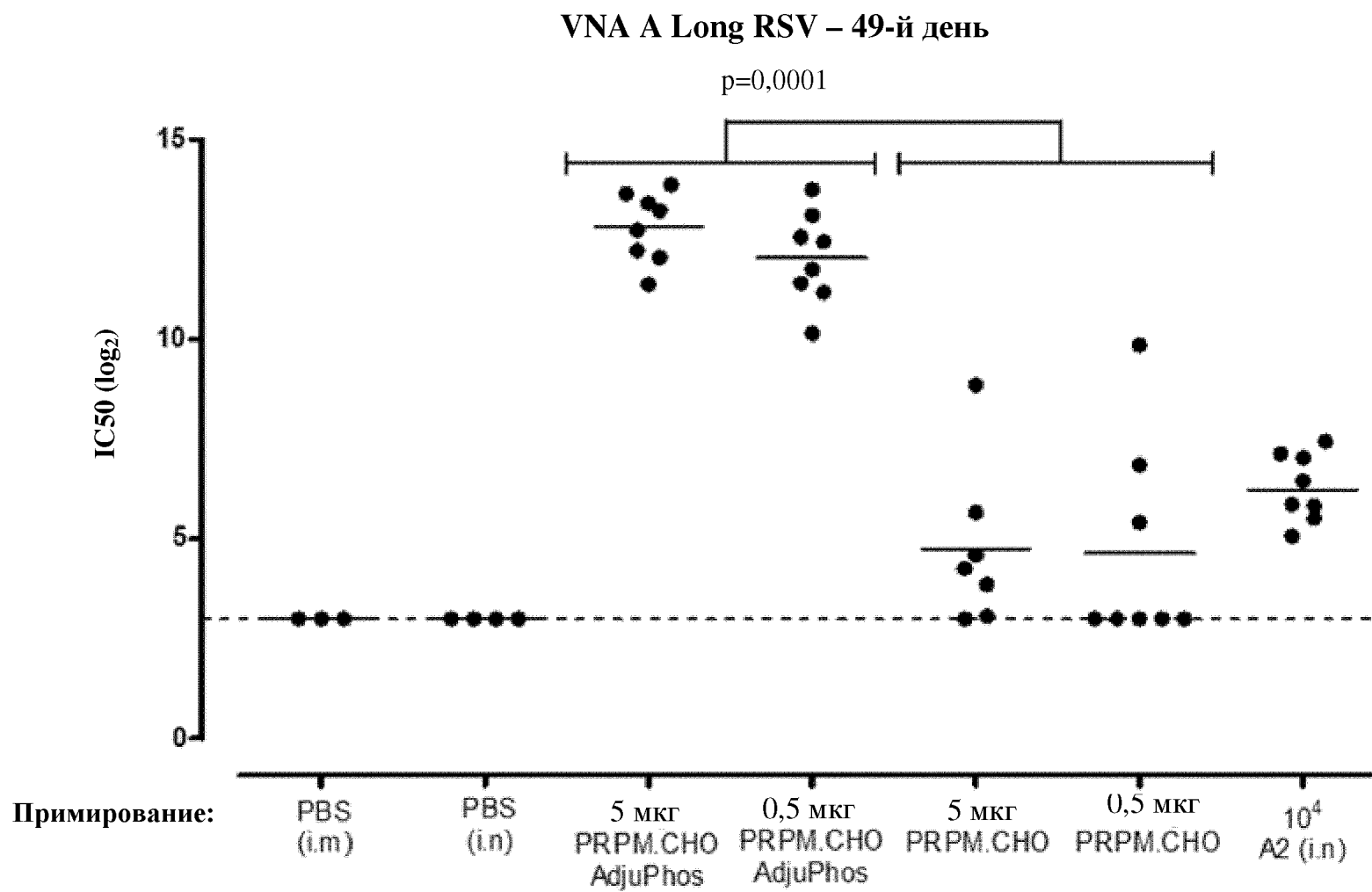
Фиг. 7 – продолжение



Фиг. 8 – продолжение



Фиг. 9



ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202191622

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

см. дополнительный лист

A61K39/155 [2006.01]

C07K 14/115 [2006.01]

C12N 5/075 [2010.01]

C12N15/63 [2006.01]

C12N15/79 [2006.01]

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

A61K39/155, C07K 14/115, C12N 5/075, C12N15/63, C12N15/79

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
EAPATIS, Patentscope, Espacenet, USPTO, SIPO, J-PlatPat, RUPTO, Embase, PubMed, Google

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к
X	KRARUP et al., "A highly stable prefusion RSV F vaccine derived from structural analysis of the fusion mechanism", Nat Commun. 2015 Sep 3;6:8143. doi: 10.1038/ncomms9143. PMID: 26333350; PMCID: PMC4569726, фиг.1, стр.2 правая колонка, 2 абзац снизу, стр.5, стр.6	1
X	EA201070794 A1 (АйДи БАЙОМЕДИКАЛ КОРПОРЕЙШН ОФ КВЕБЕК и др.), 28.02.2011, стр.7, 13, примеры: 1, 5-7	1
A	WO2014174018 A1 (CRUCCELL HOLLAND B.V.), 30.10.2014, стр.51, л.11, табл.8-12, фиг.8-9, пример 12, SEQ ID NO:74	2-7

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

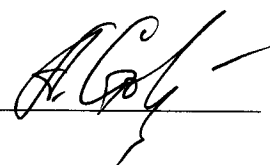
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **30/11/2021**

Уполномоченное лицо:

Заместитель начальника Управления экспертизы

Начальник отдела химии и медицины

 А.В. Чебан

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202191622

Раздел I. ЗАМЕЧАНИЯ ДЛЯ СЛУЧАЯ, КОГДА НЕКОТОРЫЕ ПУНКТЫ ФОРМУЛЫ ИЗОБРЕТЕНИЯ НЕ ПОДЛЕЖАТ ПОИСКУ

Настоящий отчет о патентном поиске не охватывает некоторые пункты формулы изобретения по следующим причинам:

1. ☐ пункты формулы изобретения №:
т.к. они относятся к объектам, указанным в правиле 3(3) Патентной инструкции к ЕАПК, а именно:

2. ☒ пункты формулы изобретения №:2 поиск проведен с учетом SEQ ID NO:2, который представляет собой аминокислотную последовательность, тогда как в п.2 указана нуклеотидная

Раздел II. ЗАМЕЧАНИЯ ДЛЯ СЛУЧАЯ НЕСОБЛЮДЕНИЯ ЕДИНСТВА ИЗОБРЕТЕНИЯ