

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202193304** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2022.07.22

(51) Int. Cl. *A61K 39/155* (2006.01)  
*C07K 14/135* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2014.04.24

---

(54) **СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ РАСТВОРИМЫЕ F-ПОЛИПЕПТИДЫ RSV ДО СЛИЯНИЯ**

---

(31) 13165402.2

(32) 2013.04.25

(33) EP

(62) 202090675; 2014.04.24

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

(72) Изобретатель:

**Лангедейк Йоханнес Петрус Мария,  
Краруп Андерс (NL)**

(74) Представитель:

**Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,  
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов  
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,  
Кузнецова Т.В., Соколов Р.А. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к стабильным F-полипептидам респираторного синцитиального вируса (RSV) до слияния, к иммуногенным композициям, содержащим указанные полипептиды, и их применениям для предупреждения и/или лечения инфекции, вызванной RSV.

**A1**

**202193304**

**202193304**

**A1**

## СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ РАСТВОРИМЫЕ F-ПОЛИПЕПТИДЫ RSV ДО СЛИЯНИЯ

Настоящее изобретение относится к области медицины. Настоящее изобретение, в частности, относится к рекомбинантному F-полипептиду RSV до слияния и к его применениям, например, в иммуногенных композициях.

### ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Респираторный синцитиальный вирус (RSV) представляет собой оболочечный вирус с несегментированной одноцепочечной РНК с негативной полярностью из семейства Paramyxoviridae, рода Pneumovirus. По оценкам в мире ежегодно наблюдается 64 миллионов инфекций RSV, которые приводят к 160000 смертей (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 возбудителем заболеваний респираторного тракта, который является причиной примерно 50% госпитализаций вследствие респираторных инфекций, с пиком госпитализации, наблюдающимся в 2-4-месячном возрасте. Сообщалось, что практически все дети к двухлетнему возрасту были инфицированы RSV. Повторные инфекции в течение жизни связаны с малоэффективным врожденным иммунитетом. У пожилых людей уровень тяжести заболевания, вызванного RSV, смертности и заболеваемости занимают второе место, уступая лишь инфекциям, вызываемым непандемическим гриппом А.

Для инфицирования клетки-хозяина RSV, подобно другим оболочечным вирусам, таким как вирус гриппа и HIV, требуют слияния вирусной мембраны с мембраной клетки-хозяина. Что касается RSV, консервативный белок слияния (F-белок RSV) подвергает слиянию вирусные мембраны и клеточные мембраны клетки-хозяина. В современных моделях на основе исследований парамиксовирусов F-белок RSV исходно уложен в конформацию "до слияния". Во время проникновения в клетку предшествующая слиянию конформация подвергается рефолдингу и конформационным изменениям до своей конформации "после слияния". Таким образом,

F-белок RSV представляет собой метастабильный белок, который управляет слиянием мембран путем сочетания необратимого рефолдинга белка с соприкосновением мембран при помощи исходного фолдинга в метастабильную форму (конформация до слияния), которая в дальнейшем подвергается дискретным/стадийным конформационным изменениям до конформации с более низкой энергией (конформации после слияния).

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)). Эти наблюдения указывают на то, что F-белок RSV до слияния и после слияния отличается в антигенном отношении (Calder, L. J. et al. Virology 271, 122-131 (2000)).

Вакцина против инфекции RSV в настоящее время не доступна, хотя и очень желательна. Кандидаты вакцин на основе F-белка RSV оказались неэффективными вследствие проблем, например, связанных со стабильностью, чистотой, воспроизводимостью и эффективностью. Как указывали 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 сосредотачивались на разработке вакцин, которые содержат формы F-белка RSV до слияния (см., например, WO20101149745, WO2010/1149743, WO2009/1079796, WO2012/158613). Однако, данные усилия не дали стабильных F-полипептидов RSV до слияния, которые можно было бы использовать в качестве кандидатов для испытания у людей.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение представляет стабильные, рекомбинантные полипептиды слияния (F) респираторного синцитиального вируса (RSV) до слияния, т.е. F-полипептиды RSV,

которые являются стабильными в конформации до слияния. F-полипептиды RSV по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один эпитоп, который является специфичным к конформации F-белка до слияния. В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния являются растворимыми. В некоторых вариантах осуществления полипептиды являются мембранно-связанными. Настоящее изобретение также представляет молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие F-полипептиды RSV до слияния согласно настоящему изобретению и векторы, содержащие такие молекулы нуклеиновых кислот.

Настоящее изобретение также относится к композициям, предпочтительно, иммуногенным композициям, содержащим F-полипептид RSV, молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор, и к их применению в индуцировании иммунного ответа против F-белка RSV, в частности, их применению в качестве вакцины. Настоящее изобретение также относится к способам индуцирования у субъекта иммунного ответа против респираторного синцитиального вируса (RSV), включающий введение субъекту эффективного количества F-полипептида RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей упомянутый F-полипептид RSV и/или вектор, содержащий молекулу упомянутой нуклеиновой кислоты. Предпочтительно, индуцированный иммунный ответ характеризуется выработкой нейтрализующих антител к RSV и/или защитным иммунитетом против RSV. В конкретных аспектах настоящее изобретение относится к способу индуцирования у субъекта выработки антител к F-белку респираторного синцитиального вируса (RSV), включающий введение субъекту эффективного количества иммуногенной композиции, содержащей F-полипептид RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей упомянутый F-полипептид RSV и/или вектор, содержащий молекулу упомянутой нуклеиновой кислоты.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

ФИГ. 1: А) гель-фильтрационная хроматограмма, полученная с использованием колонки Superdex200, элюата A2\_F24 N67I+S215P из ионообменной колонки. Стрелки указывают точки элюации стандартного белка (1 - тироглобулин 669 кДа, 2 - ферритин 440 кДа и 3 - IgG 150 кДа). В) анализ SDS-PAGE F-белка до слияния,

содержащего пик от хроматограммы SEC, в восстанавливающих условиях.

ФИГ. 2: вестерн-блоттинг NativePAGE с загрузкой образцов, содержащих 1) супернатант из клеток, экспрессирующих конструкцию до слияния с изолейциновой застежкой (S) F43; 2) супернатант из клеток, экспрессирующих главным образом тримерный (верхняя полоса) F-белок после слияния RSV; и 3) очищенный тримерный A2\_F24 N67I до слияния.

ФИГ. 3: уровни экспрессии конструкций с точечными мутациями по отношению к немутировавшему A2\_F24.

На фиг. 4 представлены результаты способа, описанного в примере 6(A), определяющего температуру, при которой происходит 50% потеря связывания CR9501; (B) представлено сравнение стабильности F до слияния (A2\_F24 N67I+S215P) и немодифицированного эктодомена при определении по 50% потере связывания специфического антитела CR9501 до слияния.

ФИГ. 5: результаты анализа Octet, представляющие зависимость от времени хранения потерю связывания специфического антитела CR9501 до слияния по отношению к конструкциям до слияния; A) A2\_F24 (SEQ ID NO: 19), B) A2\_F24 K465Q, C) A2\_F24 S46G, D) A2\_F24 N67I и E) A2\_F24 E92D на 1, 5 и 33 дни.

ФИГ. 6: результаты анализа Octet, представляющие зависимость от времени хранения потерю связывания специфического моноклонального антитела CR9501 до слияния по отношению к конструкциям до слияния; A) A2\_F24 K465Q, B) A2\_F24 K465Q+N67I, C) A2\_F24 S46G, D) A2\_F24 S46G+E92D, E) A2\_F24 S46G+N67I, F) A2\_F24 E92D, G) A2\_F24 S46G+E92D, H) A2\_F24 N67I+E92D и I) A2\_F24 E92D+S215P на 1, 5 и 33 дни.

ФИГ. 7: титры VNA у мышей на 6 неделе после прайм-бустерного введения на 0 и 4 неделе иммуногенов в дозах согласно таблице 14.

ФИГ. 8: титры VNA хлопковых крыс на 7 неделе после прайм-буста на 0 и 4 неделе иммуногенами и дозами согласно таблице 15.

ФИГ. 9: вирусная нагрузка в легких и носу на 5 день после i.n. контрольного заражения с использованием RSV.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

Белок слияния (F) респираторного синцитиального вируса (RSV) участвует в слиянии вирусной мембраны с мембраной клетки-хозяина, которое требуется для инфицирования. МРНК F RSV транслируется в белок-предшественник из 574 аминокислот, обозначенный F0, который содержит последовательность сигнального пептида на N-конце (например, аминокислотные остатки 1-26 с SEQ ID NO: 1), которая удаляется сигнальной пептидазой в эндоплазматическом ретикулуме. F0 отщепляется в двух сайтах (между аминокислотными остатками 109/110 и 136/137) с помощью клеточных протеаз (в частности, фурином) в транс-Гольджи, при этом удаляется короткая гликозилированная вставочная последовательность (также обозначенная как участок p27, содержащий аминокислотные остатки от 110 до 136, и образуется два домена или субъединицы, обозначенные F1 и F2. Домен F1 (аминокислотные остатки 137-574) содержит гидрофобный пептид слияния на своем N-конце, и C-конец содержит трансмембранный (TM) (аминокислотные остатки 530-550) и цитоплазматический участок (аминокислотные остатки 551-574). Домен F2 (аминокислотные остатки 27-109) ковалентно связан с F1 двумя дисульфидными мостиками. Гетеродимеры F1-F2 подвергаются сборке в вирионе в виде гомотримеров.

Вакцина против инфекции RSV в настоящее время не существует, хотя и является очень желательной. Одним потенциальным подходом к получению вакцины является субъединичная вакцина на основе очищенного F-белка RSV. Однако, для этого подхода желательно, чтобы очищенный F-белок RSV находился в конформации, которая подобна конформации F-белка RSV в состоянии до слияния, который стабилен в течение продолжительного периода, и может быть получен в достаточных количествах. Кроме того, для вакцины на основе субъединицы необходимо осуществить усечение F-белка RSV путем делеции трансмембранного (TM) и цитоплазматического участка с получением растворимого секретиремого F-белка (sF). Поскольку участок TM отвечает за заякоривание в мембране и тримеризацию, 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.

Стабилизация F-белка другого парамиксовируса в конформации до слияния была успешно выполнена для вируса парагриппа типа 5 (PIV5). Yin et al. (Nature 439: 38-44 (2006)) таким образом стабилизировали структуру F-белка до слияния PIV-5 с помощью мутации в сайта расщепления фурином в F<sub>0</sub>, что блокировало процессинг в F1 и F2. Кроме того, трансмембранный (TM) и цитоплазматический домен были замещены широко известным петлевым доменом тримеризации: GCN4pII. Этот домен образует тримерную спиральную суперспиральную структуру и является модификацией встречающегося в природе димерного спирального суперспирального пептида GCN4 (O'Shea et al., Science 243: 538-542 (1989)). Пептид GCN4-pII, в котором аминокислотная последовательность лейциновой застёжки GCN4 была замещена изолейциновыми остатками в каждом положении *a* и *d* гептада, как показано, образует трехцепочечную параллельную альфа-петлевую суперспираль (Harbury et al., Science 262: 1401-1407 (1993)).

Для стабилизации F RSV в конформации до слияния использовали ту же стратегию, такую как, например, мутация в сайте расщепления фурином, и слияние эктодомена RSV-F с доменом тримеризации GCN4pII (как раскрыто, например, в WO2010/149743, WO2010/149745, WO2009/079796, WO2012/158613) или с доменом тримеризации фибритина (McLellan et al., Nature Struct. Biol. 17: 248-250 (2010)). Этот домен фибритина или 'Foldon' получен из фибритина T4 и описан ранее в качестве искусственного встречающегося в природе домена тримеризации (Letarov et al., Biochemistry Moscow 64: 817-823 (1993); S-Guthe et al., J. Mol. Biol. 337: 905-915. (2004)). Однако, эти усилия не привели к получению стабильного белка RSV-F до слияния. Более того, эти усилия даже не привели к получению кандидатов, пригодных для испытания у людей.

Настоящее изобретение далее представляет стабильные рекомбинантные F-полипептиды RSV до слияния, т.е. F-полипептиды RSV, которые являются стабилизированными в конформации до слияния. В исследовании, которое привело к настоящему изобретению, были введены и/или объединены несколько стадий модификации для получения упомянутых стабильных растворимых F-полипептидов RSV до слияния. Стабильные F-полипептиды RSV до слияния по настоящему изобретению находятся в конформации до слияния, т.е. они содержат (демонстрируют) по меньшей мере один эпитоп, который является специфичным к конформации F-белка до слияния. Эпитоп, который является специфичным к конформации F-белка до слияния, представляет собой эпитоп, который не представлен в конформации после слияния. Не ограничиваясь конкретной теорией, полагают, что конформация F-белка RSV до слияния может содержать эпитопы, которые являются такими же, как эпитопы на F-белке RSV, экспрессируемые на встречающихся в природе вирионах RSV, и таким образом, может предоставлять преимущества для активизации защитных нейтрализующих антител.

В определенных вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один эпитоп, который распознается специфическим моноклональным антителом до слияния, содержащим CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 54, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 55, CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 56 и CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 62, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 63 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 64 (далее в этом документе упоминаемый как CR9501), и/или специфическим моноклональным антителом до слияния, содержащим CDR1-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 58, CDR2-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 59, CDR3-участок тяжелой цепи с SEQ ID NO: 60 и CDR1-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 66, CDR2-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 67 и CDR3-участок легкой цепи с SEQ ID NO: 68 (упоминаемый как CR9502). CR9501 и CR9502 содержат переменные участки тяжелой и легкой цепи, и таким образом, связывающие специфичности 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 (смотри WO2012/006596).

В определенных вариантах осуществления рекомбинантные F-полипептиды RSV до слияния содержат по меньшей мере один эпитоп, который распознается по меньшей мере одним специфичным моноклональным антителом до слияния, как описано выше, и полипептиды являются тримерными.

В определенных вариантах осуществления стабильные F-полипептиды RSV до слияния в соответствии с настоящим изобретением содержат мутацию аминокислотного остатка в положении 67 и/или мутацию аминокислотного остатка в положении 215.

В некоторых вариантах осуществления аминокислоту в положении 67 подвергают мутированию до гидрофобной аминокислоты.

В некоторых вариантах осуществления стабильные F-полипептиды RSV до слияния в соответствии с настоящим изобретением содержат мутацию аминокислотного остатка N или T в положении 67 и/или мутацию аминокислотного остатка S в положении 215.

В некоторых вариантах осуществления стабильные F-полипептиды RSV до слияния в соответствии с настоящим изобретением содержат домен F1 и домен F2 и связывающую последовательность, содержащую от 1 до 10 аминокислотных остатков, которая связывает указанный домен F1 с указанным доменом F2, где полипептиды дополнительно содержат мутацию аминокислотного остатка N или T в положении 67 и/или мутацию аминокислотного остатка S в положении 215.

В определенных вариантах осуществления стабильные F-полипептиды RSV до слияния в соответствии с настоящим изобретением содержат усеченный домен F1 и домен F2, и связывающую последовательность, содержащую от 1 до 10 аминокислотных остатков, связывающую указанный усеченный домен F1 с указанным доменом F2, где полипептиды дополнительно содержат мутацию аминокислотного остатка N или T в положении 67 и/или мутацию аминокислотного остатка S в положении 215.

Таким образом, полипептиды по настоящему изобретению

содержат по меньшей мере одну стабилизирующую мутацию в домене F1 и/или домене F2 по сравнению с доменом F1 и/или F2 RSV в F-белке RSV дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния содержат мутацию аминокислотного остатка N или T в положении 67 (N/T67I) в I и/или мутацию аминокислотного остатка S в положении 215 в P (S215P).

Известно, что RSV существуют в виде одного серотипа, имеющего две антигенные подгруппы: A и B. Аминокислотные последовательности зрелых процессированных F-белков двух групп являются идентичными на приблизительно 93%. Как используется во всей настоящей заявке, положения аминокислот приведены в отношении к последовательности F-белка RSV из штамма A2 (SEQ ID NO: 1). Как используется в настоящем изобретении, выражение "аминокислота в положении "x" F-белка RSV, таким образом, означает аминокислоту, соответствующую аминокислоте в положении "x" в F-белке RSV штамма A2 RSV с SEQ ID NO: 1. Необходимо отметить, что в системе нумерации, используемой в настоящей заявке, 1 относится к N-концевой аминокислоте незрелого F0-белка (SEQ ID NO: 1). При использовании штамма RSV, отличного от штамма A2, положения аминокислот F-белка следует нумеровать по отношению к нумерации F-белка штамма A2 SEQ ID NO: 1 с помощью выравнивания последовательностей другого штамма RSV с F-белком с SEQ ID NO: 1 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.

Аминокислота в соответствии с настоящим изобретением может быть любой из двадцати встречающихся в природе (или 'стандартных' аминокислот) или их вариантов, таких как, например, D-аминокислоты (D-энантиомеры аминокислот с хиральным центром), или любым вариантом, которые не встречаются в природе в белках, таких как норлейцин. Стандартные аминокислоты можно разделить на несколько групп, исходя из их свойств. Важными факторами являются заряд, гидрофильность или гидрофобность, размер и функциональные группы. Эти свойства являются важными

для структуры белков и белок-белковых взаимодействий. Некоторые аминокислоты обладают специфическими свойствами, такие как цистеин, который может образовывать ковалентные дисульфидные связи (или дисульфидные мостики) с другими цистеиновыми остатками, пролин, который индуцирует повороты полипептидного остова, и глицин, который является более гибким, чем другие аминокислоты. В таблице 11 представлены аббревиатуры и свойства стандартных аминокислот.

Опытному специалисту следует принять во внимание, что мутации можно осуществлять с белком при помощи стандартных методик молекулярной биологии. Результатом мутаций в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно является повышенные уровни экспрессии и/или повышенные стабилизации F-полипептидов RSV до слияния по сравнению с F-полипептидами RSV, которые не содержат данную (данные) мутацию (мутации).

В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния являются растворимыми.

В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния дополнительно содержат гетерологичный домен тримеризации, связанный с упомянутым усеченным доменом F1. В соответствии с настоящим изобретением было показано, что путем связывания гетерологического домена тримеризации с C-концевым аминокислотным остатком усеченного домена F1, необязательно объединенного со связывающей последовательностью, связывающей домен F1 и F2, и стабилизирующей (стабилизирующими) мутацией (мутациями), представлены F-полипептиды RSV, которые демонстрируют высокую экспрессию и которые связываются со специфичными антителами до слияния, указывая, что полипептиды находятся в конформации до слияния. Кроме того, F-полипептиды RSV стабилизированы в конформации до слияния, т.е. даже после процессинга полипептидов они по-прежнему связаны со специфичными антителами CR9501 и/или CR9502 до слияния, указывая, что специфический эпитоп до слияния сохраняется.

В дополнительных вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния содержат одну или несколько дополнительных мутаций (по сравнению с F-белком RSV дикого типа), выбранных из группы,

состоящей из:

- (a) мутации аминокислотного остатка в положении 46;
- (b) мутации аминокислотного остатка в положении 77;
- (c) мутации аминокислотного остатка в положении 80;
- (d) мутации аминокислотного остатка в положении 92;
- (e) мутации аминокислотного остатка в положении 175;
- (f) мутации аминокислотного остатка в положении 184;
- (g) мутации аминокислотного остатка в положении 185;
- (h) мутации аминокислотного остатка в положении 201;
- (i) мутации аминокислотного остатка в положении 209;
- (j) мутации аминокислотного остатка в положении 421;
- (k) мутации аминокислотного остатка в положении 426;
- (l) мутации аминокислотного остатка в положении 465;
- (m) мутации аминокислотного остатка в положении 486;
- (n) мутации аминокислотного остатка в положении 487 и
- (o) мутации аминокислотного остатка в положении 508.

В предпочтительных вариантах осуществления одна или несколько дополнительных мутаций выбраны из группы, состоящей из:

- (a) мутации аминокислотного остатка S в положении 46 в G (S46G);
- (b) мутации аминокислотного остатка K в положении 77 в E (K77E);
- (c) мутации аминокислотного остатка K в положении 80 в E (K80E);
- (d) мутации аминокислотного остатка E в положении 92 в D (E92D);
- (e) мутации аминокислотного остатка N в положении 175 в P (N175P);
- (f) мутации аминокислотного остатка G в положении 184 в N (G184N);
- (g) мутации аминокислотного остатка V в положении 185 в N (V185N);
- (h) мутации аминокислотного остатка K в положении 201 в Q (K201Q);
- (i) мутации аминокислотного остатка K в положении 209 в Q

(K209Q);

(j) мутации аминокислотного остатка К в положении 421 в N (K421N);

(k) мутации аминокислотного остатка N в положении 426 в S (N426S);

(l) мутации аминокислотного остатка К в положении 465 в E или Q (K465Q);

(m) мутации аминокислотного остатка D в положении 486 в N (D486N);

(n) мутации аминокислотного остатка E в положении 487 в Q, N или I (E487Q/N/I) и

(o) мутации аминокислотного остатка К в положении 508 в E (K508E).

Снова необходимо отметить, что для положений аминокислотных остатков отсчет выполняется по отношению к SEQ ID NO: 1. Специалист сможет определить соответствующие аминокислотные остатки в F-белках других штаммов RSV.

В определенных вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния содержат по меньшей мере две мутации (по сравнению с F-белком RSV дикого типа). В предпочтительных вариантах осуществления по меньшей мере двумя мутациями являются мутация аминокислоты N или T в положении 67 в I (N/T67I) и мутация аминокислоты S в положении 215 в P (S215P).

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

(a) мутации аминокислотного остатка S в положении 46 в G;

(b) мутации аминокислотного остатка К в положении 77 в E;

(c) мутации аминокислотного остатка К в положении 80 в E;

(d) мутации аминокислотного остатка E в положении 92 в D;

(e) мутации аминокислотного остатка N в положении 175 в P;

(f) мутации аминокислотного остатка G в положении 184 в N;

(g) мутации аминокислотного остатка V в положении 185 в N;

(h) мутации аминокислотного остатка К в положении 201 в Q;

(i) мутации аминокислотного остатка К в положении 209 в Q;

(j) мутации аминокислотного остатка К в положении 421 в N;

(k) мутации аминокислотного остатка N в положении 426 в S;

(l) мутации аминокислотного остатка K в положении 465 в E или Q;

(m) мутации аминокислотного остатка D в положении 486 в N;

(n) мутации аминокислотного остатка E в положении 487 в Q, N или I и

(o) мутации аминокислотного остатка K или R в положении 508 в E.

В определенных вариантах осуществления полипептиды содержат по меньшей мере три мутации.

В определенных вариантах осуществления гетерологичный домен тримеризации содержит аминокислотную последовательность ЕККІЕАІЕККІЕАІЕККІЕА (SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления гетерологичный домен тримеризации содержит аминокислотную последовательность GYІPEAPRDGQAYVRKDGЕWVLLSTFL (SEQ ID NO: 4).

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

В некоторых вариантах осуществления домен F1 усекают после аминокислотного остатка 495 в F-белке RSV (обозначенного SEQ ID NO: 1), т.е. C-концевая часть домена F1, начиная с аминокислотного остатка 496 (обозначенного SEQ ID NO: 1) была удалена. В некоторых вариантах осуществления домен F1 усекают после аминокислотного остатка 513 в F-белке RSV. В некоторых вариантах осуществления домен F1 усекают после аминокислотного остатка 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 525 или 525.

В некоторых вариантах осуществления домен тримеризации связан с аминокислотным остатком 495 домена F1 RSV. В некоторых вариантах осуществления домен тримеризации содержит SEQ ID NO: 4 и связан с аминокислотным остатком 495 домена F1 RSV.

В некоторых других вариантах осуществления домен тримеризации связан с аминокислотным остатком 513 домена F1 RSV. В некоторых вариантах осуществления домен тримеризации содержит SEQ ID NO: 3 и связан с аминокислотным остатком 513 домена F1 RSV.

В некоторых вариантах осуществления домен F1, который является необязательно усеченным, и домен F2 связаны при помощи связывающей последовательности, которая связывает С-концевую аминокислоту домена F2 с N-концевой аминокислотой (необязательно усеченного) домена F1. В некоторых вариантах связывающая последовательность (или линкер) содержит от 1 до 10 аминокислотных остатков, предпочтительно от 2 до 9 аминокислотных остатков, предпочтительно от 3 до 8 аминокислотных остатков, предпочтительно от 4 до 7 аминокислотных остатков, более предпочтительно линкер содержит 5 или 6 аминокислотных остатков. В данной области техники известны несколько конформационно нейтральных линкеров, которые можно использовать в соответствии с настоящим изобретением без нарушения конформации F-полипептидов RVS до слияния. В предпочтительных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность GSGSG (SEQ ID NO: 5).

В некоторых вариантах осуществления домен F1 и/или домен F2 происходят из штамма A RSV. В некоторых вариантах осуществления домен F1 и/или F2 происходят из штамма A2 RSV с SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления домен F1 и/или домен F2 происходят из штамма A RSV с SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления домен F1 и/или домен F2 происходят из штамма B RSV. В некоторых вариантах осуществления домен F1 и/или F2 происходят из штамма B RSV SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления домен F1 и/или F2 происходят из одного штамма RSV. В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния являются химерными полипептидами, т.е. содержат домены F1 и F2, которые происходят из разных штаммов RSV.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии F-полипептидов RSV до слияния настоящего изобретения повышен по сравнению с эктодоменом F-полипептида RSV дикого типа (т.е. без трансмембранного или цитоплазматического участка) без мутации (мутаций). В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии повышен по меньшей мере в 5 раз, предпочтительно до 10 раз. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии повышен более чем в 10 раз.

F-полипептиды RSV до слияния в соответствии с настоящим изобретением являются стабильными, т.е. не изменяются с легкостью в конформацию после слияния при процессинге полипептидов, таком как, например, очистка, циклы замораживания-оттаивания и/или хранение и т.д.

В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния в соответствии с настоящим изобретением имеют повышенную стабильность при хранении при 4°C по сравнению с F-полипептидом RSV без мутации (мутаций). В некоторых вариантах осуществления полипептиды являются стабильными при хранении при 4°C в течение по меньшей мере 30 дней, предпочтительно по меньшей мере 60 дней, предпочтительно по меньшей мере 6 месяцев, даже более предпочтительно по меньшей мере 1 года. Под "стабильными при хранении" подразумевается, что полипептиды по-прежнему демонстрируют по меньшей мере один эпитоп, который является специфичным для специфического антитела до слияния (например, CR9501) при хранении полипептида в растворе (например, среде для культивирования) при 4°C в течение по меньшей мере 30 дней, например, как определено с помощью способа, описанного в примере 7 или 9. В некоторых вариантах осуществления полипептиды демонстрируют по меньшей мере один специфичный эпитоп до слияния в течение по меньшей мере 6

месяцев, предпочтительно в течение по меньшей мере 1 года при хранении F-полипептидов RSV до слияния при 4°C.

В некоторых вариантах осуществления F-полипептиды RSV в соответствии с настоящим изобретением обладают повышенной стабильностью при воздействии теплом по сравнению с F-полипептидами RSV без указанной (указанных) мутации (мутаций). В определенных вариантах осуществления F-полипептиды RSV до слияния являются термостабильными в течение по меньшей мере 30 минут при температуре 55°C, предпочтительно при 58°C, более предпочтительно при 60°C. Под "термостабильными" подразумевается, что полипептиды по-прежнему демонстрируют по меньшей мере один специфичный эпитоп до слияния после воздействия повышенной температурой в течение по меньшей мере 30 минут (т.е. температуры 55°C или выше), например, как определено с помощью способа, описанного в примере 6.

В определенных вариантах осуществления полипептиды демонстрируют по меньшей мере один специфичный эпитоп до слияния после воздействия от 1 до 6 циклов замораживания-размораживания в подходящей буферной смеси.

В некоторых вариантах осуществления F-полипептид RSV до слияния по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21-52 и 71-89. В определенных вариантах осуществления F-полипептид RSV до слияния по настоящему изобретению состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21-52 и 71-89.

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

В некоторых вариантах осуществления кодируемые полипептиды в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержат лидерную последовательность, также называемую как сигнальная последовательность или сигнальный пептид, соответствующую аминокислотам 1-26 в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO:

69. Она представляет собой короткий (длиной как правило, 5-30 аминокислот) пептид, присутствующий на N-конце большинства вновь синтезируемых белков, которые предназначены для поступления в секреторный путь. В некоторых вариантах осуществления полипептиды в соответствии с настоящим изобретением не содержат лидерную последовательность.

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

В определенных вариантах осуществления полипептиды не содержат HIS-метку. В соответствии с настоящим изобретением неожиданно было показано, что при удалении HIS-метки уровень экспрессии и стабильность повышаются по сравнению с полипептидами с HIS-меткой.

Настоящее изобретение дополнительно представляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей F-полипептиды RSV в соответствии с настоящим изобретением.

В предпочтительных вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды в соответствии с настоящим изобретением, являются оптимизированными по кодонам для экспрессии в клетках млекопитающих, предпочтительно клетках человека. Способы оптимизации по кодонам известны или 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, и 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, таких как в <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 наиболее часто используемые кодоны в организме используются в оптимизированной по кодам последовательности. Замещение предпочтительными кодонами, как правило, приводит к более высокой экспрессии.

Специалисту в данной области будет понятно, что несколько различных молекул полинуклеотидов и нуклеиновых кислот могут кодировать один и тот же полипептид в результате вырожденности генетического кода. Также понятно, что специалисты в данной области могут при помощи традиционных методик проводить нуклеотидные замены, которые не влияют на последовательность полипептида, кодируемую молекулами нуклеиновых кислот, для отражения частоты использования кодонов любым конкретным организмом-хозяином, в котором полипептиды будут экспрессироваться. Следовательно, если конкретно 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 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 проводить с использованием стандартных процедур при помощи компаний, предоставляющих услуги в области синтеза ДНК и/или молекулярного клонирования (например, GeneArt, GenScripts, Invitrogen, Eurofins).

Настоящее изобретение также представляет векторы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, как описано выше. Таким образом, в определенных вариантах осуществления молекула

нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением является частью вектора. Такими векторами можно легко манипулировать с помощью способов, хорошо известных специалисту в данной области, и например, их 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. Используемый вектор может представлять собой любой вектор, который подходит для клонирования ДНК и который можно использовать для транскрипции нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. Подходящими векторами в соответствии с настоящим изобретением являются, например, аденовекторы, такие как Ad26 или Ad35, альфавирус, парамиксовирус, вирус осповакцины, вирус герпеса, ретровирусные векторы и т.д. Специалист в данной области может выбрать подходящие векторы экспрессии и вставить последовательности нуклеиновых кислот настоящего изобретения функциональным образом.

Клетки-хозяева, содержащие молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие F-полипептиды RSV до слияния, также образуют часть настоящего изобретения. F-полипептиды RSV до слияния можно получить 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 НЕК293, 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 клетками являются клетки млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления клетками являются клетки человека. В целом получение рекомбинантных белков, таких как F-полипептиды RSV до слияния по настоящему изобретению, в клетке-

хозяине предусматривает введение гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид в экспрессируемом формате, в клетку-хозяина, культивирование клеток в условиях, способствующих экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты и обеспечение экспрессии полипептида в указанной клетке. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок в экспрессируемом формате, может находиться в форме кассеты экспрессии и обычно требует последовательностей, способствующих экспрессии нуклеиновой кислоты, таких как энхансер(ы), промотор, сигнал полиаденилирования и т.п. Специалист в данной области осведомлен о том, что разные промоторы можно использовать для обеспечения экспрессии гена в клетках-хозяевах. Промоторы могут быть конститутивными или регулируемыми, и их можно получать из разных источников, в том числе, вирусов, прокариотических или эукариотических источников, или получать искусственным путем.

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

"Гетерологической молекулой нуклеиновой кислоты" (также называемой в данном документе как 'трансен') является молекула нуклеиновой кислоты, которая в природе не присутствует в клетке-хозяине. Ее вводят, например, в вектор с помощью стандартных методик молекулярной биологии. Трансен обычно функционально связан с последовательностями, контролирующими экспрессию. Это можно выполнить, например, путем помещения нуклеиновой кислоты, кодирующей трансен(ы), под контроль промотора. Можно добавлять дополнительные регуляторные последовательности. Многие промоторы можно использовать для экспрессии трансгена (трансгенов), 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 CMV (патент США № 5385839), например, предранний промотор CMV, например,

содержащий нуклеотиды от -735 до +95 из энхансера/промотора предраннего гена CMV. Сигнал полиаденилирования, например, сигнал polyA гена бычьего гормона роста (патент США № 5122458) может располагаться позади трансгена(ов). В качестве альтернативы, несколько широко используемых векторов экспрессии доступны в данной области и их получают из коммерческих источников, например, серии векторов pcDNA и pEF 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, 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 культурального флакона или к микроносителям, а также суспензионную культуру. Манипуляции с суспензионными культурами наиболее крупного масштаба проводят в периодическом процессе или процессе с подпиткой, поскольку они являются наиболее простыми для управления и увеличения масштаба. 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 согласно стандартным протоколам. 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 (смотри, 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 представляет композиции, содержащие F-полипептиды RSV до слияния и/или молекулу нуклеиновой кислоты, и/или вектор, как описано выше. Настоящее

изобретение также представляет композиции, содержащие F-полипептид RSV до слияния, который демонстрирует эпитоп, присутствующий в конформации F-белка RSV до слияния, но отсутствует в конформации после слияния. Настоящее изобретение также представляет композиции, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор, кодирующие такой F-полипептид RSV до слияния. Настоящее изобретение также представляет иммуногенные композиции, содержащие F-полипептиды RSV до слияния, и/или молекулу нуклеиновой кислоты, и/или вектор, как описано выше. Настоящее изобретение также представляет применение стабилизированного F-полипептида RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектор в соответствии с настоящим изобретением для индуцирования у субъекта иммунного ответа к F-белку RSV. Дополнительно представлены способы индуцирования у субъекта иммунного ответа к F-белку RSV, предусматривающие введение субъекту F-полипептида RSV до слияния, и/или молекулу нуклеиновой кислоты, и/или вектор в соответствии с настоящим изобретением. Также представлены F-полипептиды RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты, и/или векторы в соответствии с настоящим изобретением для индуцирования иммунного ответа у субъекта к F-белку RSV. Также представлено применение F-полипептидов RSV до слияния, и/или молекул нуклеиновой кислоты, и/или векторов в соответствии с настоящим изобретением для получения лекарственного средства для применения в индуцировании у субъекта иммунного ответа к F-белку RSV.

F-полипептиды RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты или векторы по настоящему изобретению можно использовать для предупреждения (профилактики) и/или для лечения инфекций RSV. В определенных вариантах осуществления предупреждение и/или лечение может быть направлено на группы пациентов, которые восприимчивы к инфекции RSV. Такие группы пациентов включают без ограничений, например, пожилых (например,  $\geq 50$  лет,  $\geq 60$  лет и предпочтительно  $\geq 65$  лет), молодых (например,  $\leq 5$  лет  $\leq 1$  лет), госпитализированных пациент и пациентов, которые получали лечение противовирусными соединениями, но проявили недостаточный ответ на лечение противовирусными соединениями.

F-полипептиды RSV до слияния, молекулы нуклеиновых кислот и/или векторы в соответствии с настоящим изобретением можно использовать, например, в самостоятельном лечении и/или профилактике заболевания или состояния, вызванного RSV, или в комбинации с другими профилактическими и/или терапевтическими средствами лечения, такими как (существующими или будущими) вакцины, противовирусные средства и/или моноклональные антитела.

Настоящее изобретение дополнительно представляет способы предупреждения и/или лечения у субъекта инфекции RSV с использованием F-полипептидов 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 RSV предусматривает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества F-полипептида RSV до слияния, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектора, описанных выше. Терапевтически эффективное количество относится к количеству полипептида, молекулы нуклеиновой кислоты или вектора, которое является эффективным для предупреждения, уменьшение интенсивности 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, связанных с инфекцией, вызванной RSV. Уменьшение интенсивности, 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 использоваться фармацевтические композиции, содержащие F-полипептид RSV до слияния, молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В настоящем контексте выражение "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель или наполнитель в используемых

дозировках и концентрациях не вызовет каких-либо нежелательных или вредных эффектов у субъектов, которым их вводят. Такие фармацевтически приемлемые носители и наполнители хорошо известны из уровня техники (смотри 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-полипептиды RSV или молекулы нуклеиновой кислоты предпочтительно составляют и вводят в виде стерильного раствора, хотя также возможно использование лиофилизированных препаратов. Стерильные растворы получают путем стерильной фильтрации или с помощью других способов, широко известных из уровня техники. Затем растворы лиофилизируют или расфасовывают по контейнерам, предназначенным для лекарственных форм. pH раствора обычно находится в диапазоне от pH 3,0 до pH 9,5, например, от pH 5,0 до pH 7,5. F-полипептиды RSV обычно находятся в растворе, имеющем подходящий фармацевтически приемлемый буфер, и композиция может также содержать соль. Необязательно может присутствовать стабилизирующее средство, такое как альбумин. В определенных вариантах осуществления добавляют детергент. В определенных вариантах осуществления F-полипептиды RSV можно составлять в виде инъекционного препарата.

В некоторых вариантах осуществления композиция в соответствии с настоящим изобретением дополнительно содержит один или несколько адъювантов. Адъюванты, известные из уровня техники, дополнительно повышают иммунный ответ к применяемой антигенной детерминанте. Выражения "адъювант" и "иммуностимулятор" используют 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 к F-полипептидам 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 (смотри, например, WO 90/14837); составы с сапонидами, такие как, например, QS21 и иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS) (смотри, например, US 5057540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); производные бактерий или микроорганизмов, примерами которых являются монофосфорил липид А (MPL), 3-О-деацелированный 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 др.), которые стимулируют иммунный ответ при взаимодействии с клетками реципиентов. В определенных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат в качестве адъюванта алюминий, например, в форме гидроксида алюминия, фосфата алюминия, фосфата алюминия-калия или их комбинации в концентрациях 0,05-5 мг, например, 0,075-1,0 мг алюминия из расчета на дозу.

F-полипептиды RSV до слияния можно также вводить в комбинации с наночастицами или конъюгированными с наночастицами, такими как, например, полимерами, липосомами, виросомами, вирус-подобными частицами. F-полипептиды до слияния можно комбинировать с наночастицами, инкапсулировать в наночастицах или конъюгировать 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 определенных вариантах осуществления настоящее изобретение представляет способы получения вакцины против респираторного синцитиального вируса (RSV), включающие обеспечение композиции в соответствии с настоящим изобретением

и помещение ее в фармацевтически приемлемую композицию. Выражение "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, связанных с инфекцией патогенным микроорганизмом или заболеванием. В настоящем изобретении вакцина содержит эффективное количество F-полипептида RSV до слияния и/или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей F-полипептид RSV до слияния, и/или вектор, содержащий указанную молекулу нуклеиновой кислоты, который приводит к образованию иммунного ответа к F-белку 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. Выражение "вакцина" согласно настоящему изобретению подразумевает, что она представляет собой фармацевтическую композицию, и, таким образом, как правило, включает фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или наполнитель. Она может содержать или не содержать дополнительные активные ингредиенты. В определенных вариантах осуществления она может представлять собой комбинированную вакцину, которая дополнительно содержит другие компоненты, которые индуцируют иммунный ответ, например, против других белков RSV и/или против других возбудителей инфекции. Введение дополнительных активных компонентов можно, например, осуществлять путем отдельного введения или путем введения комбинации продуктов из вакцин по настоящему изобретению и дополнительных активных компонентов.

Композиции можно вводить субъекту, например, субъекту-человеку. Суммарная доза F-полипептидов RSV в композиции для однократного введения может, например, составлять от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 10 мг, например, 1 мкг - 1 мг, например, 10 мкг - 100 мкг. Определение

рекомендуемой дозы будет осуществляться в процессе эксперимента и является стандартным для специалистов в данной области.

Введение композиций в соответствии с настоящим изобретением можно осуществлять с использованием 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 известны различные возможности введения композиции, например вакцины, для индуцирования иммунного ответа к антигену (антигенам), присутствующему в вакцине.

Субъект, как используется в данном документе, предпочтительно представляет собой млекопитающее, например, грызуна, например, мышь, хлопкового хомяка или примата, кроме человека, или человека. Предпочтительно субъект представляет собой субъекта-человека.

Полипептиды, молекулы нуклеиновых кислот, векторы и/или комбинации можно также вводить в виде прайма или в виде буста в гомологичном или гетерологичном режиме прайм-буст. При проведении бустерной вакцинации обычно такую бустерную вакцину будут вводить одному и тому же субъекту с промежутком от одной недели до одного года, предпочтительно от двух недель до четырех месяцев после введения композиции субъекту в первый раз (которое в данном случае называется "первичной вакцинацией"). В некоторых вариантах осуществления введение включает прайм и по меньшей мере одно бустерное введение.

Кроме того, полипептиды по настоящему изобретению можно использовать в качестве диагностического средства, например, для проверки иммунного статуса индивидуума путем определения способности антител в сыворотке такого индивида к связыванию с полипептидами по настоящему изобретению. Настоящее изобретение также относится к *in vitro* диагностическому способу для выявления у пациента присутствия инфекции RSV, при этом указанный способ включает стадии а) приведения в контакт

биологического образца, полученного от указанного пациента, с полипептидом в соответствии с настоящим изобретением; и b) выявления присутствия комплексов антитело-полипептид.

Настоящее изобретение дополнительно представляет способ стабилизации конформации F-полипептида RSV до слияния, включающий введение одной или нескольких мутаций в домен F1 и/или F2 RSV, по сравнению с доменом F1 и/или F2 RSV дикого типа, где одна или несколько мутаций выбраны группы, состоящей из

(a) стабилизирующей мутации, которая блокирует вращение домена HRA в участке, прилегающем к консервативному дисульфидному мостику 69-212, при этом указанный мостик содержит аминокислотные остатки 66-68 и 214-216,

(b) мутации в спирали (в С-конце домена F2), содержащей аминокислотные остатки 76-98 в С-конце домена F2;

(c) мутации, которая снижает отталкивание отрицательных зарядов между верхними частями участка стебля HRB (N-концевой конец HRB), содержащего аминокислоты 486, 487 и 489; и

(d) стабилизирующей мутации в участке HRA.

В определенных вариантах осуществления мутация в шарнирном участке HRA находится в положении 67.

В определенных вариантах осуществления мутация в шарнирном участке HRA находится в положении 215.

В определенных вариантах осуществления мутация в шарнирном участке HRA находится в положении 66 или 68 и/или в положении 214 или 216.

В определенных вариантах осуществления мутация в спирали находится в положении 77.

В определенных вариантах осуществления мутация в спирали находится в положении 80.

В определенных вариантах осуществления аминокислотный остаток в положении 77 и/или 80 изменяется в отрицательно заряженную аминокислоту.

В определенных вариантах осуществления мутация находится в положении 92.

В определенных вариантах осуществления мутация, которая

снижает отталкивание отрицательных зарядов между верхними частями участка стебля HRB, содержит аминокислоты 486, 487, 489.

В определенных вариантах осуществления мутация находится в положении 489.

В определенных вариантах осуществления мутация находится в положении 486.

В определенных вариантах осуществления мутация стабилизирует бета-повороты между аминокислотными остатками 175-193.

В определенных вариантах осуществления мутация стабилизирует поворот в положении 175.

В определенных вариантах осуществления мутация стабилизирует поворот в положении 184-185.

Стабилизированные F-полипептиды RSV до слияния, получаемые и/или полученные с помощью такого способа, также образуют часть настоящего изобретения, а также варианты их применения, как описано выше.

Далее настоящее изобретение поясняют следующими примерами. Данные примеры не ограничивают настоящее изобретение каким-либо образом. Они служат лишь для пояснения настоящего изобретения.

#### **ПРИМЕРЫ**

##### **ПРИМЕР 1**

#### **Получение стабильных F-полипептидов RSV до слияния - линкеры и домены тримеризации**

В исследовании, которое привело к настоящему изобретению, стабилизированные варианты растворимых F-белков (sF) до слияния конструировали путем стабилизации двух основных участков, которые инициируют рефолдинг. Первой стратегией было блокирование пептида слияния в его положении и предотвращение его высвобождения из головного участка путем фиксации и соединения доменов F1-F2 с помощью короткой петли. Высвобождение пептида слияния можно предотвратить с помощью перенесения ковалентного соединения N-конца F1 к C-концу F2. Как показано в этом примере, подвергли испытаниям ряд разных линкеров. Вставка 5-аминокислотной петли между F1 и F2, в

частности, содержащей аминокислотную последовательность GSGSG (SEQ ID NO: 5), была наиболее успешной. Этот линкер конструировали исходя из расстояния, определенного в 3D модели гомологии, которая была получена для RSV-F типа A2 на основе выравнивания последовательности с F-последовательностью вируса парагриппа 5 типа, для которого опубликована 3D структура (Yin et. al., 2006).

```

AAA47881PIV5      -----MGTIIQFLVVSCLLAGAGSLDPAALMQIGVIPTNVRQIMYYTEASSA
FUS_HRSV1B       -----MELLIHRSSAIFLTLAVNALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYT
ACO83301HRSVA2ref -----MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYT
                  ..*  *.. :   :.. . : *   ... :   . :

```

```

AAA47881PIV5      FIVVKLMPTIDSPISGCNI--TSISSYNATVTKLLQPIGENLETIRNQLIP--TRRRRR-
FUS_HRSV1B       SVITIELSNIKET--KCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRAREAP
ACO83301HRSVA2ref SVITIELSNIKKN--KCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELP
                  ::.  :..*..  **   :... :   : *   ::. *   ::.  .   **.
```

```

AAA47881PIV5      -----FAGVVIGLAALGVATAAQVTAVALVKANENAAAILNLKNAIQ
FUS_HRSV1B       QYMNNTINTTKNLNVSISKRRKRFLGFLGVSIAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKIKNALL
ACO83301HRSVA2ref RFMNYTLNNAKKTNTLSKRRKRFLGFLGVSIAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKIKSALL
                  :   : :...: :...:*: * . . . : :*:.*:
```

```

AAA47881PIV5      KTNAAVADVQATQSLGTAVQAVQDHINSVSPAITAANCKAQDAIIGSIILNLYLTELT
FUS_HRSV1B       STNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYINNRLLEPIVNQQSCRISNIETVIEFQQMNSRLL
ACO83301HRSVA2ref STNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLEPIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLL
                  .* * *... :... * : *   :...*:.. : * .. .* .. : : ..*
```

```

AAA47881PIV5      IFHNQITNP-ALSPITIQALRILLGSTLPTVVEKSFNTQISAAELLSSGLLTGQIVGLDL
FUS_HRSV1B       ITREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSII
ACO83301HRSVA2ref ITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSII
                  * ::  .* . . :*::  *   :* . . : : :   . :   :
```

```

AAA47881PIV5      TYMQMVIKIELPTLTVQPATQIIDLATISAFI--NNQEVMAQL--PTRVMVTG--SLIQA
FUS_HRSV1B        KEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFF
ACO83301HRSVA2ref KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFF
.  .:  ::*  *  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:
.  .:  ::*  *  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:

AAA47881PIV5      YPASQCTITPNTVYCRYNDAQVLSDDTMAQLQGN---LTRCTFSPVVGSLTRFVLFDDGI
FUS_HRSV1B        PQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLG-
ACO83301HRSVA2ref PQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLGNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLG-
.  .:  ::*  *  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:
.  .:  ::*  *  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:

AAA47881PIV5      VYANCRS-MLCKCMQPAAVILQPSSSPVTVIDMYKCVSLQLDNLRFTITQLANVTYNSTI
FUS_HRSV1B        AIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKNLYVKG
ACO83301HRSVA2ref AIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKG
.  .:  ::*  *  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:
.  .:  ::*  *  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:

AAA47881PIV5      KLESS--QILSIDPLDISQNLAAVNKSLSDALQHLAQSDTYLSAITSATTTTS--VLSIIA
FUS_HRSV1B        EPIINYYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVNTGKSTTNIMITTII
ACO83301HRSVA2ref EPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKSTTNIMITTII
.  .:  ::*  *  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:
.  .:  ::*  *  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:

AAA47881PIV5      ICLGSLGLLIIILLSVVWVWLLTIVVANRNRMENFVYHK-----
FUS_HRSV1B        IVIIVVLLSLIAIGLLLYCKAKNTPVTLTKDQLSGINNIAFSK-----
ACO83301HRSVA2ref IVIIVVLLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN-----
.  .:  ::*  *  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:
.  .:  ::*  *  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:  .  .:  .:

```

Выравнивание между F-последовательностью HRSV типа A и B с PIV5 (верхняя последовательность), которую использовали для конструирования модели гомологии RSV-F до слияния

Другим нестабильным участком является второй гептадный повтор (HRB), который образует тримерный спиральный участок стебля в F-белке до слияния. Делеция трансмембранного домена (TM) в растворимом F-белке дополнительно дестабилизирует этот участок, что было восполнено добавлением различных гетерологических доменов тримеризации. Полностью процессированный зрелый эктодомен RSV-F сливали на С-конце с

различными доменами тримеризации и в различных положениях (т.е. домен F1 усекали по различным аминокислотным остаткам).

Несколько конструкций получали на основе штаммов A2 или B1 RSV. Различные домены тримеризации связывали с доменом F1 RSV, который усекали по различным положениям. Домены тримеризации, которые исследовали, включали мотив фибритина (содержащий аминокислотную последовательность: GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 4), и мотив "фибрин длинный", более длинный, растянутый на N-конце домен фибритина, который включает его встречающиеся в природе спиральные участки (содержащие аминокислотную последовательность: SSLQGDVQALQEAGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO: 6), которые добавляли к F1-домену RSV в рамке (в регистре) с предполагаемым гептадным повтором участка HRB.

Полученные дополнительные конструкции содержали гептадные идеальные спиральные тримерные суперспирали, или домен изолейциновой застежки (IZ) (Suzuki et al., Protein Engineering 11: 1051-1055 (1998)), содержащие аминокислотную последовательность: IEAIEKK (SEQ ID NO: 7). В соответствии с настоящим изобретением использовали различные домены IZ, обозначенные как изолейциновая застежка (L), содержащая аминокислотную последовательность (I)EKKIEAIEKKIEAIEKKIEAIEAIEKKIEA (SEQ ID NO: 8), и изолейциновая застежка (S), содержащая аминокислотную последовательность EKKIEAIEKKIEAIEKKIEA (SEQ ID NO: 3).

Эти домены IZ сопоставимы по структуре с GCN4, однако, домены IZ не являются встречающимися в природе последовательностями, а сконструированы для того, чтобы быть оптимальными доменами тримеризации, и поэтому более стабильными.

Дополнительные конструкции получали с другими известными доменами тримеризации:

#### GCN4 II

EDKIEEILSKIYHIEAIEARIKKLIGEA (SEQ ID NO: 9)

#### Оптимизированный GCN4 II

EDKVEELLSKIYHIEAIEARIKLVGEA (SEQ ID NO: 10)

**Матриллин -1 (длинная версия)**

EEDPCECKSIVKFKQTKVEELINTLQOKLEAVAKRIEALENKII (SEQ ID NO: 11)

**Матриллин - 1 которая версия, которая содержит только домен застежки:**

EELINTLQOKLEAVAKRIEALENKII (SEQ ID NO: 12)

Получали следующие конструкции:

конструкция F18 содержала домен тримеризации фибритина (SEQ ID NO: 4), связанный с аминокислотным остатком 513 домена F1.

Конструкция F19 содержала домен тримеризации фибритина (SEQ ID NO: 4), связанный с аминокислотным остатком 499 домена F1.

Конструкция F20 содержала домен изолейциновой застежки (L) (SEQ ID NO: 8), связанный с аминокислотным остатком 516 домена F1 и содержащий дополнительные модификации в HRB для оптимизации гидрофобной природы гептадных положений и облегчения слияния с доменом IZ с сохранением рамки считывания.

Конструкция F21 также содержала домен изолейциновой застежки (L) (SEQ ID NO: 8), но связанный с аминокислотным остатком 501 домена F1 и без дополнительных модификаций в участке HRB.

Конструкция F22 содержала домен изолейциновой застежки (L) (SEQ ID NO: 8), связанный с аминокислотным остатком 495 домена F1 и содержащий дополнительные модификации в HRB.

Конструкция F23 содержала домен изолейциновой застежки (S) (SEQ ID NO: 3), связанный с аминокислотным остатком 495.

Конструкция F46 содержала домен изолейциновой застежки (S) (SEQ ID NO: 3), но связанный с более длинным эктодоменом RSV-F, т.е. домен F1 усекали после аминокислотного остатка 513.

Все конструкции содержали HIS-метку.

Конструкции исследовали в отношении уровней экспрессии, стабильности при хранении и связывания с антителом CR9501. Аминокислотные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепи и CDR тяжелой и легкой цепи этого антитела приведены ниже. CR9501 содержит связывающие участки антител,

обозначенных как 58C5 в W02012/006596.

Конструкции синтезировали и оптимизировали по кодонам в Gene Art (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния). Конструкции клонировали в pCDNA2004 или создавали при помощи стандартных способов, широко известных в данной области, включая сайт-направленный мутагенез и ПЦР, и секвенировали. Используемой системой экспрессии были клетки 293Freestyle (Life Technologies). Клетки временно трансфицировали с помощью 293Fectin (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя и культивировали в течение 5 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 фильтровали в стерильных условиях с помощью 0,22 мкм вакуумного фильтра и хранили при 4°C до использования.

Супернатанты с 5 дня оценивали в отношении экспрессии F-белка с помощью вестерн-блоттинга, используя моноклональное антитело CR9503, которое содержит переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела к F RSV мотавизумаб (обозначенного как CR9503). Приблизительные уровни экспрессии конструкций F-белка RSV до слияния определяли с использованием CR9503, вторичного антитела, конъюгированного с IR-красителем, к иммуноглобулину человека (Li-Cor, Линкольн, Небраска) или HRP-конъюгированного мышиного антитела к IgG человека (Jackson ImmunoResearch, Вест Гров, Пенсильвания). Затем определяли количества белка с помощью серии разбавлений очищенного стандартного белка RSV, или визуально на глаз, или с использованием системы Odyssey CLx для инфракрасной визуализации. Альтернативно использовали количественный октет (интерферометрия BioLayer) для определения концентрации белка в супернатантах. Для определения стабильности конструкций и выявления положительных или отрицательных влияющих стабилизирующих эффектов введенных мотивов тримеризации, конструкции, способные к связыванию с CR9501, обрабатывали в диапазоне температур от 45 до 65°C в течение 30 минут для исследования стабильности эпитопа CR9501.

Эта процедура подробно описана в примере 8. Результаты обобщены в таблице 1.

Таблица 1

Экспрессия и стабильность конструкций F RSV с различными мотивами тримеризации

Белок RSV	Описание				Стабильность*
	Мотив тримеризации	Модификации	Точка терминации	Экспрессия (мкг/мл)	
F18	Фибритин	Отсутствуют	513	2	Нестабильный
F19	Фибритин	Отсутствуют	499	0	ND
F20	Изолейциновая застежка (L)	502 509 516 Ile	516	0	ND
F21	Изолейциновая застежка (L)	Отсутствуют	501	0	ND
F22	Изолейциновая застежка (L)	K483E+E488K	495	0	ND
F23	Изолейциновая застежка (S)	Отсутствуют	495	0,3 <sup>1</sup>	Стабильный
F46	Изолейциновая застежка (S)	Отсутствуют	513	Не экспрессировал	ND

\*Стабильность определяли, как описано в примере 7; ND: не определяли.

<sup>1</sup> Уровень экспрессии определяли с помощью вестерн-блоттинга, как описано в примере 1.

Как можно увидеть в таблице 1, единственными конструкциями, которые экспрессировались, были варианты фибритина (F18) и F23. Несмотря на то, что F18 был тримерным и демонстрировал экспрессию, он был нестабильным при хранении при 4°C. В противоположность этому, F23 был стабильным при 4°C, связывался со специфичными антителами до слияния, но, по-видимому, был мономерным. Таким образом, оба варианта F18 и F23 использовали для оптимизации стабильности и тримеризации.

Затем получали несколько конструкций, в которых пептид слияния на N-конце F1 был прикреплен путем слияния с C-концом домена F2. Все конструкции содержали His-метку.

Получали несколько конструкций, в том числе конструкции, в которых сайты расщепления фурином подвергали мутации, что приводило к образованию растворимого F-белка, который по-прежнему содержал пептид p27 (т.е. F12, F15.1 и F17). В других конструкциях участок из 27 остатков (петля P27), который отщеплялся от предшественника F0, замещали альтернативной закрытой петлей или связывающей последовательностью: с помощью замещения участка RSV-F 'гомологичным' участком PIV-5 F, F-белком до слияния, который получали и успешно кристаллизовали (F25), или путем замещения участка минимальной (GS)<sub>n</sub> петлей, которая бы связывала с помощью мостика концы F2 и F1 (F24), или путем замещения участка центральным консервативным участком RSV-G (F26). Моделирование гомологии RSV-F на основе PIV-5 и измерений *in silico* привело в результате к выбору минимальной петли из 5 аминокислотных остатков между остатками 108 и 136. В качестве линкера выбирали остатки Gly (G) и Ser (S), которые являются гибкими и полярными и имеют высокую вероятность быть внесенными (F24). Кроме того, F137 подвергали мутации в S, поскольку локальные модификации, вызванные петлей, могли смещать гидрофобный F и вызывать нестабильности. Это представлено ниже. Также R106 подвергали мутированию в Q и замещали 27 остатков (109-135), используя GSGSG.

PAANNRARREAPQYMN~~Y~~TINTTKNLNVSISKRRKR<sub>136</sub>FLGFLLGVG

PAANNQAR GSGSGR<sub>136</sub>SLGFLLGVG

Как представлено в таблице 2, все варианты не демонстрировали экспрессию или демонстрировали очень низкую экспрессию, за исключением варианта с короткой петлей GSGSG (F24), которая демонстрировала намного более высокую экспрессию (44 мкг/мл) по сравнению с конструкцией на основе F дикого типа RSV, т.е. подобной конструкцией, но без указанного линкера (F11). F24, который являлся тримерным, был, однако, нестабильным при хранении подобно всем другими вариантам с С-концевым мотивом тримеризации фибритина. Все варианты содержали HIS-метку.

Таблица 2

Экспрессия и стабильность конструкций на основе F RSV с различными линкерами F1-F2

Белок RSV	Вариант	Описание					Стабильность*
		Мотив тримеризации	Линкер F1, F2	Модификации	Точка терминации	Экспрессия (мкг/мл)	
F11	B1	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	513	2,5	Стабильный
F18	B1	Фибритин	Отсутствует	Отсутствует	513	2	Нестабильный
F12	B1	Фибритин	p27	КО сайта для фурина	513	0,1	Нестабильный
F15,1	B1	Отсутствует	p27	КО сайта для фурина	525	0,5	ND
F17	A2	Фибритин	p27	КО сайта для фурина	513	0	ND
F24	B1	Фибритин	Q__GSGSG_S	Отсутствует	513	44	Нестабильный
F25	B1	Фибритин	PIV	Отсутствует	513	0	ND
F26	B1	Фибритин	G CR	Отсутствует	513	0	ND

\*Стабильность определяли, как описано в примере 7. Уровень экспрессии определяли, как описано в примере 1

Затем, наиболее подходящие модификации комбинировали для поиска оптимальных F-полипептидов до слияния. Комбинации получали из вариантов с петлей GSGSG, C-концевым усечением F1 и добавлением мотива фибритина (SEQ ID NO: 4) или изолейциновой застежки (S) (SEQ ID NO: 3) (смотри таблицу 3).

Таблица 3

Экспрессия и стабильность конструкций на основе F RSV с комбинациями оптимизаций согласно таблицам 1 и 2

Белок RSV	Вариант	Точка терминации	Описание			Стабильность эпитопа CR9501	
			Мотив тримеризации	Линкер F1, F2	(мкг/мл)	Термостабильность (°C)	Хранение
F11	B1	513	Отсутствует	Отсутствует	2,5	48	Стабильный
F23	B1	495	Изолейциновая застежка (S)	Отсутствует	0,3	ND	Стабильный
F24	B1	513	Фибритин	Q__GSGSG_S	44	51	Нестабильный
F45	B1	495	Фибритин	Отсутствует	0	ND	ND
F44	B1	495	Фибритин	Q__GSGSG_S	0	ND	ND
F49	B1	495	Отсутствует	Отсутствует	2	ND	Стабильный
F50	A2	495	Отсутствует	Отсутствует	2	ND	Стабильный
F43	B1	495	Изолейциновая застежка (S)	Q__GSGSG_S	0,4	53	Стабильный
F47	A2	495	Изолейциновая застежка (S)	Q__GSGSG_S	5	52	Стабильный
F56	B1	513	Изолейциновая застежка (S)	Q__GSGSG_S	0,4	ND	Стабильный

F46	B1	513	Изолейциновая застёжка (S)	Отсутствует	0	ND	Нестабильный
F42	B1	513	Отсутствует	Q__GSGSG_S	20	54	Стабильный
F57	A2	513	Отсутствует	Q__GSGSG_S	2-10	54	Стабильный

ND - не определено.

\*Стабильность при хранении, как определяли в примере 7. \*Термостабильность, как определяли в примере 8. Уровень экспрессии определяли с помощью вестерн-блоттинга (описано в примере 1)

Добавление петли GSGSG всегда повышало экспрессию функциональных конструкций, а также термостабильность белка. Комбинация петли GSGSG с усеченным F и мотивом изолейциновой застежки (S) (F43, F47) продемонстрировала высокую экспрессию, термостабильность и значительную стабильность в хранении при 4°C. Однако, эти варианты были по-прежнему мономерными. Мотив тримеризации с изолейциновой застежкой (S) демонстрировал более высокую экспрессию с вариантом F, который представлял собой F, усеченный на C-конце в положении 495 (сравните F43 с F56 и F23 с F46). В противоположность этому, для вариантов с доменом тримеризации фибритина усечение в положении 513 продемонстрировало высокую экспрессию по сравнению с усечением в положении 495, которое не демонстрировало экспрессии (сравните F24 с F44).

Поскольку HIS-метку могла нарушать нативный фолдинг тримеров, то конструировали варианты без HIS-метки для фибритина и варианта изолейциновой застежки (S) (таблица 4).

Таблица 4

Экспрессия и стабильность конструкций на основе F RSV с HIS-меткой и без HIS-метки

Белок RSV	Вариант	Мотив тримеризации	Линкер F1, F2	Точка термиминации	Экспрессия мкг/мл	% тримеризации	Термостабильность (°C)	Хранение	Метки
F24	B1	Фибритин	Q_GSGSG_S	513	44	Тримерный (SEC)	51	Нестабильный	HIS-метка
F24-	B1	Фибритин	Q_GSGSG_S	513	55	100% (нативный)	ND	Нестабильный	Отсутствует
F47	A2	Изолейциновая застежка (S)	Q_GSGSG_S	495	5	0% (Odyssey)	52	Стабильный	HIS-метка
F47-	A2	Изолейциновая застежка (S)	Q_GSGSG_S	495	10	2-5% (Odyssey)	53	Стабильный	Отсутствует
A2_F24	A2	Фибритин	Q_GSGSG_S	513	5,3	Тримерный (нативный)	48,75	Нестабильный	Отсутствует

\*Стабильность при хранении определяли, как описано в примере 7; термостабильность определяли, как описано в примере 8; ND: не определено.

Удивительным являлось то, что делеция HIS-метки повышала экспрессию в F47. Более того, для F47 она немного повышала содержание тримеров и для F24 она умеренно повышала только уровень экспрессии.

Затем, изучали несколько альтернативных доменов тримеризации и усечений в комбинации со стабилизированным петлей GSGSG вариантом F (F47) (смотри таблицу 5). Все варианты имеют петлю GSGSG и содержат HIS-метку.

Таблица 5

Экспрессия и стабильность вариантов на основе F RSV с альтернативными доменами тримеризации

Белок RSV	Вариант	Описание				% тримери- зации	Связывание антитела	
		Мотив тримеризации	Модификации	Точка терминации	Экспрессия (мкг/мл)		CR9501	CR9503
F47	A2	Изолейциновая застежка (S)	Нет	495	5	0%	+	+
P1	B1	Изолейциновая застежка (S)	S502T	502	3,5	0%	+	+
Mat1	A2	Матриллин длинный	Отсутствует	520	12	Три- и гексадимеры	-	+
Mat2	A2	Матриллин короткий	Отсутствует	516	0	ND	-	-
Mat3	A2	Матриллин короткий	Отсутствует	495	1,5	ND	-	-
Оптимизи- рованный GCN	A2	Оптимизированный GCN4II	Отсутствует	516	0	ND	-	-
Оптимизи- рованный GCN+L512K	A2	Оптимизированный GCN4II	L512K	516	1	ND	+	-

Связывание антитела определяли как связывание в день сбора клеток (как описано в примере 7);

+ указывает связывание; - указывает отсутствие связывания.

Уровень экспрессии определяли, как описано в примере 1. ND: не определено.

Только домен матрилина 1 (Dames-SA et. al., Nat. Struc. Biol., 5(8), 1998), который содержит и N-концевой домен застежки, и C-концевую часть с остатками цистеина, которые могут потенциально образовывать дисульфидные мостики между тримерами, как было обнаружено, способен к более высоким уровням экспрессии, чем F47 (таблица 5, матрилин длинный). Более того, вариант с мотивом тримеризации матрилина длинного демонстрирует тримерные F-белки. Однако, продукт не связывался со специфическим Mab CR9501 до слияния и также демонстрировал гексамерные молекулы, которые делают домен тримеризации матрилина 1 не подходящим для получения тримерного нативного F-белка. Никакой из мотивов застежки на основе матрилина или на основе GCN4II не демонстрировал повышенной экспрессии или стабильности по отношению к F47 (таблица 5, матрилин короткий, GCN4II-оптимизированный). Снова усечение на 495 приводит к более высоким уровням экспрессии. Добавление мотива GCN4, который содержал оптимизированную триггерную последовательность, не продемонстрировало экспрессии.

GCN4 II представляет собой домен тримеризации, который успешно используют для стабилизации тримера вируса парагриппа типа 5 до слияния (Yin et al., Nature 439:38-44, 2006) и его испытывали другие для стабилизации F RSV до слияния (как раскрыто, например, в WO2010/149743, WO2010/14975, WO2009/079796, WO2010/158613). Домен тримеризации GCN4II оценивали и сравнивали с другими конструкциями, которые содержат домен изолейциновой застежки (S) (SEQ ID NO: 3) или домен фибритина (SEQ ID NO: 4) (результаты представлены в таблице 6). Эти варианты также сравнивали с другими модификациями, т.е. коротким линкером на основе одной мутации лизина и L512K. Все варианты содержали HIS-метку.

Таблица 6

Экспрессия и стабильность вариантов F RSV с замещением GCN4II, L512K и p27  
(один аминокислотный линкер (K) между F1 и F2)

Белок RSV	Вариант	Описание					Стабильность	
		Мотив тримеризации	Линкер F1, F2	Модификации	Точка терминации	Экспрессия (мкг/мл)	Термоста- бильность (°C)	Хранение*
F18	B1	Фибритин	Отсутствует	Отсутствует	513	2	ND	Неста- бильный
F24	B1	Фибритин	Q__GSGSG_S	Отсутствует	513	44	51	Неста- бильный
F43	B1	Изолейциновая застежка (S)	Q__GSGSG_S	Отсутствует	495	0,4	53	Стабильный
P1	B1	Изолейциновая застежка (S)	Q__GSGSG_S	S502T	502	3,5	54	ND
F42	B1	Отсутствует	Q GSGSG S	Отсутствует	513	16,1	54	Стабильный
P2	B1	Отсутствует	K	Отсутствует	513	14,3	54	Стабильный
P3	B1	GCN4II	Отсутствует	L512K	516	0	ND	ND
P4	B1	GCN4II	K	L512K	516	0	ND	ND
P5	B1	GCN4II	K	L512K	516	0	ND	ND
P6	A2 †	GCN4II	K	L512K	516	0	ND	ND
P7	A2	GCN4II	K	L512K	516	0	ND	ND

Стабильность при хранении определяли, как описано в примере 7; уровни экспрессии определяли, как описано в примере 1; термостабильность определяли, как описано в примере 8; ND: не определено.

Короткая связь между F1 и F2, по-видимому, сопоставима с петлей GSGSG. Добавление мотива GCN4II не приводит в результате к какой-либо экспрессии F-белка в какой-либо из исследованных конструкций (т.е. ни в последовательности F RSV A2, описанной в WO2010/149743 или WO2010/149745, ни в последовательности F RSV A2, используемой в соответствии с настоящим изобретением, ни последовательности F RSV B1).

Было показано, в соответствии с настоящим изобретением, что введение этих двух типов модификаций, т.е. введение связывающей последовательности и гетерологического домена тримеризации, было недостаточно для обеспечения экспрессии стабильного тримерного F-белка до слияния. Помимо этих двух основных участков нестабильности, которые были стабилизированы, т.е. HRB и пептида слияния, как описано выше, другие участки в F-белке до слияния также способствуют значительному рефолдингу и/или вносят значительный рефолдинг в F после слияния, и можно оптимизировать больше положений в последовательности для остановки рефолдинга F-белка до слияния. Таким образом, разные аминокислотные остатки в домене HRA и HRB и во всех доменах, которые контактируют с этими участками в F до слияния, подвергали мутированию для повышения структурной стабильности до слияния, как описано в следующих примерах.

#### ПРИМЕР 2

#### **Получение стабильных F-полипептидов RSV до слияния - стабилизирующие мутации**

Поскольку содержание тримеров (для конструкции F47) и стабильность при хранении (для конструкции F24) не были оптимальными, создавали дополнительные варианты, которые содержали точечные мутации для повышения уровней экспрессии, стабильности и нативной тримерной структуры. Результаты представлены в таблице 7 и 8.

Экспрессия и стабильность вариантов F47-

Белок RSV	Экспрессия (мкг/мл)	% тримеризации	Термоста- бильность (°C)
F47-	10	2-5%	53
F47-+K465E	6	2,4%	ND
F47-+D479K	5	29%	50,77
F47-+K176M	13	5%	ND
F47-+K209Q	9	3%	52,9
F47-+S46G	38	11%	59,38
F47-+S215P	8	1-2%	57,21
F47-+N67I	15	2%	59,84
F47-+K465Q	18	2%	54,3
F47- S46G+N67I	31	6%	>60
F47- S46G+S215P	38	6%	>60
F47- K465Q+K209Q	12	1%	53,3
F47- K465Q+S46G	28	7%	57,7
F47- K465Q+N67I	17	2%	59
F47- K209Q+N67I	15	4%	>60
F47- K209Q+S215P	15	2%	56,7

ND: не определено; уровень экспрессии определяли, как описано в примере 1. Термостабильность определяли, как описано в примере 8

Номенклатура мутаций на основе последовательности дикого типа (SEQ ID NO: 1).

Все конструкции являются вариантами F47-: тип A2, мотив изолейциновой застёжки (S) (SEQ ID NO: 3), линкер GSGSG; точка терминации 495, без HIS-метки (SEQ ID NO: 16). Как представлено в таблице 7, многие мутации повышали экспрессию F47-, но только вариант F47\_S46G одновременно демонстрировал более высокий уровень тримеров, помимо высокой экспрессии.

В таблице 8 представлены результаты экспрессии и стабильности вариантов для F24. Все варианты представляли собой RSV типа A2, с мотивом фибритина, линкером GSGSG; точкой терминации 513, без HIS-метки.

Экспрессия и стабильность вариантов A2\_F24- (SEQ ID NO: 19)

Белок RSV	Экспрессия (мкг/мл)	Хранение	
		Конечная точка	Фазовая ассоциация
A2_F24	5,3	69	ND
A2_F24 K508E	5,3	64	ND
A2_F24 K498E	1,7	ND	ND
A2_F24 E487I	25,0	10	ND
A2_F24 E487K	7,1	ND	ND
A2_F24 E487N	42,4	22	ND
A2_F24 E487P	12,8	46	ND
A2_F24 E487Q*	14,8	50	ND
A2_F24 E487R	8,7	59	ND
A2_F24 E487S	6,7	46	ND
A2_F24 E487Y	10,5	36	ND
A2_F24 D486N	31,2	19	ND
A2_F24 D479N	5,2	ND	ND
A2_F24 D479K	1,5	62	ND
A2_F24 E472Q	1,9	ND	ND
A2_F24 E472K	0,9	ND	ND
A2_F24 K465E	14,8	76	ND
A2_F24 K465Q*	13,6	92	Нестабильный
A2_F24 E463K	3,1	ND	ND
A2_F24 E463Q	6,0	ND	ND
A2_F24 G430S	4,8	ND	ND
A2_F24 N428R	5,2	35	ND
A2_F24 N426S	18,6	71	ND
A2_F24 K421N	9,2	75	ND
A2_F24 E328K	9,5	21	ND
A2_F24 T311S	3,5	70	ND
A2_F24 I309V	11,3	69	ND
A2_F24 D269V	0,0	ND	ND
A2_F24 S215P*	18,7	99	Стабильный

A2_F24 K209Q	31,4	63	ND
A2_F24 V207P	3,3	79	ND
A2_F24 I206P	5,4	55	ND
A2_F24 L204P	5,9	ND	ND
A2_F24 L203P	0,8	ND	ND
A2_F24 Q202P	4,4	ND	ND
A2_F24 K201Q	21,3	62	ND
A2_F24 D194P	1,9	ND	ND
A2_F24 L193P	6,5	42	ND
A2_F24 V192P	0,6	32	ND
A2_F24 V185N	50,2	38	ND
A2_F24 GV184EG	3,5	ND	ND
A2_F24 G184N	59,8	37	ND
A2_F24 V178P	14,8	23	ND
A2_F24 A177P	2,0	ND	ND
A2_F24 K176M	14,7	58	ND
A2_F24 K176E	0,7	ND	ND
A2_F24 N175P	34,3	55	ND
A2_F24 S169P	0,5	ND	ND
A2_F24 K168P	0,1	ND	ND
A2_F24 K166P	12,3	45	ND
A2_F24 V157P	0,2	ND	ND
A2_F24 E92D	47,4	94	Нестабильный
A2_F24 K85E	1,1	ND	ND
A2_F24 K80E	51,9	60	ND
A2_F24 K77E	22,4	ND	ND
A2_F24 N67I*	89,8	101	Стабильный
A2_F24 I57V		ND	ND
A2_F24 VI56IV	16,5	54	ND
A2_F24 S46G*	40,7	96	Нестабильный

Помеченные \* конструкции подвергали тестированию в отношении тримеризации, и было установлено, что все являлись тримерными

Уровень экспрессии определяли, как описано в примере 1. Конечная стабильность представлена в данном документе в виде

процента связывания антитела до слияния (CR9501) через 5 дней хранения при 4°C по отношению к 1 дню; стабильность фазовой ассоциации определяют, как описано в примере 9.

Многие мутации повышали экспрессию A2\_F24-. Для большинства мутаций наблюдали видимую взаимосвязь между повышенной экспрессией на фоне F47- (таблица 7) и на фоне A2\_F24- (таблица 8). N67I оказывала более положительное влияние на экспрессию F на фоне A2\_F24-. Наиболее значимого повышения экспрессии достигали с использованием единичных точечных мутаций: S46G, S215P, N67I, K80E, E92D, D486N, G184N, V185N, E487N, N175P, K209Q, E487I, E487Q, K77E, K201Q, N426S и K465Q. При первичном скрининге с помощью анализа конечной стабильности (пример 7) варианты с наиболее высокой экспрессией также демонстрировали лучшую стабильность при хранении (E92D, K465Q, K465E, N426S, S46G, S215P и N67I). Для того чтобы оценить, действительно ли эти мутации стабилизируют конформацию до слияния, супернатанты культур разводили до 5 и 10 мкг/мл, исходя из результатов количественного вестерн-блоттинга, и их хранили до 33 дней при 4°C. В качестве точечных мутантов только N67I и S215P были полностью стабильны со временем (смотри пример 9).

Затем несколько мутаций, которые демонстрировали высокую экспрессию и надлежащую стабильность конформации до слияния, комбинировали для того чтобы оценить, были ли стабилизации аддитивными или имели ли возможный синергетический эффект (таблица 9).

Таблица 9

Экспрессия и стабильность вариантов A2\_F24 с двумя дополнительными мутациями

Белок RSV	Экспрессия (мкг/мл)	Стабильность*
A2_F24 K465Q+S46G	21,8	Нестабильный
A2_F24 K465Q+N67I	122,3	Стабильный
A2_F24 K465Q+E92D	10,5	Стабильный
A2_F24 K465Q+S215P	59,8	Стабильный

A2_F24 S46G+N67I	115,5	Стабильный
A2_F24 S46G+E92D	14,3	Нестабильный
A2_F24 N67I+E92D	134,2	Стабильный
A2_F24 N67I+S215P	152,1	Стабильный
A2_F24 E92D+S215P	49,1	Стабильный
A2_F24 K465Q+S215P	53,3	Стабильный
A2_F24 S46G+S215P	43,8	Стабильный

Стабильность при хранении относится к анализу фазовой ассоциации, представленной в примере 9.

Уровень экспрессии определяли, как описано в примере 1.

Все варианты являлись вариантами F24-: A2 типа, мотив фибритина, линкер GSGSG; точка терминации 513, связывание со всеми Mab, без HIS-метки (SEQ ID NO: 19).

При комбинировании ранее выявленных точечных мутаций можно было наблюдать очень интересные синергетические эффекты в отношении уровней экспрессии с комбинациями, включающими N67I в качестве наиболее эффективной. Все полученные двойные мутанты, независимо от того была ли включена N67I или S215P, были стабильными спустя более 30 дней при хранении при 4°C (пример 9). Неожиданным образом, было установлено, мутация N67I оказывала наиболее сильный эффект на уровне экспрессии F до слияния при включении в двойные мутанты. Также комбинации с мутациями S215P приводили к умеренной экспрессии. Выбирали комбинацию N67I с S215P, поскольку она приводила к очень высокому уровню экспрессии, и поскольку обе точечные мутации были стабильными при хранении. Кроме того, было отмечено, что N67I и S215P обладали способностью стабилизировать некоторые мутанты, которые в качестве единичных мутаций были нестабильными, указывая на то, что участок, где эти две мутации встречались, является центральным для конформационных изменений, которым подвергается белок во время перехода к конформации после слияния.

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением было показано, что по меньшей мере некоторые мутации приводили в результате к повышенным уровням экспрессии и повышенной

стабилизации белка RSV до слияния. Предполагается, что эти явления связаны. Мутации, описанные в этом примере, все в результате приводили к повышенному продуцированию F-полипептидов до слияния. Только выбор этих полипептидов оставался стабильным при длительном хранении (смотри пример 9). Используемый анализ стабильности основывается на потере специфического эпитопа CR9501 до слияния в верхней части F до слияния в анализе связывания и он может быть недостаточно чувствительным для определения всех вкладов в стабильность всего белка. Мутации, для которых наблюдали только повышенную экспрессию, являются, таким образом (вероятно стабилизирующими), потенциальными мутациями, которые можно комбинировать с другими стабилизирующими мутациями для получения F-конструкции до слияния с высокой стабильностью и высокими уровнями экспрессии.

Затем проверяли, была ли способна двойная мутация N67I - S215P, подобно единичным мутациям, стабилизировать точечные мутации, которые, как единичные мутации считались нестабильными на основании использованных критериев. Выбирали дополнительные мутации на основе подходящих уровней экспрессии и стабильности в соответствии с таблицей 8. Разрабатывали и исследовали в отношении уровней экспрессии и стабильности варианты тройных мутантных RSV-F (таблица 10).

Таблица 10

Экспрессия и стабильность вариантов F24\_N67I +S215P с одной дополнительной мутацией

Белок RSV	Экспрессия (мкг/мл)	Стабильность*
A2_F24 N67I+S215P+K507E	344,6	++
A2_F24 N67I+S215P+E487I	239,4	+++
A2_F24 N67I+S215P+E487N	285,2	+++
A2_F24 N67I+S215P+E487Q	360,7	+++
A2_F24 N67I+S215P+E487R	130,9	+++
A2_F24 N67I+S215P+D486N	292,6	+++
A2_F24 N67I+S215P+D479N	97,1	+++
A2_F24 N67I+S215P+K465Q	283,3	+++

A2_F24 N67I+S215P+N426S	316,3	+++
A2_F24 N67I+S215P+K421N	288,4	+++
A2_F24 N67I+S215P+K209Q	245,0	+++
A2_F24 N67I+S215P+K201Q	231,9	+++
A2_F24 N67I+S215P+V185N	445,1	+++
A2_F24 N67I+S215P+G184N	326,7	+++
A2_F24 N67I+S215P+E92D	308,8	+
A2_F24 N67I+S215P+K80E	210,6	+
A2_F24 N67I+S215P+S46G	199,4	+++

Все варианты были вариантами A2\_F24\_N67I +S215P A2 типа, мотив фибритина, линкер GSGSG; точка терминации 513, связывание со всеми Mab, без HIS-метки (SEQ ID NO: 21).

\*Стабильность относится к анализу фазовой ассоциации, представленной в примере 9.

+ означает <10% потери связывания CR9501 через 5 дней; ++ означает <5% потери связывания CR9501 через 5 дней; +++ означает 0% потери связывания CR9501 через 5 дней.

Снова наблюдали аддитивный эффект в отношении уровней экспрессии. Как ожидалось, тройные мутанты D479N и E487R экспрессируют при несколько меньших уровнях, поскольку единичные мутанты также находились среди наиболее низких из выбранных мутаций (таблица 8). В связи со стабилизирующим эффектом мутации N67I+S215P, дополнительные мутации, которые являются нестабильными в качестве единичных мутаций, приводили к образованию стабильных вариантов F до слияния при добавлении к фону A2\_F24 N67I+S215P. Некоторыми наиболее иллюстративными примерами являются тройные мутанты с дополнительной V185N, G184N или E487N, которые демонстрировали высокую экспрессию, но низкую стабильность в качестве единичных мутантов (таблица 8), но демонстрировали даже более высокую экспрессию и были высокостабильными при добавлении к фону A2\_F24 N67I+S215P.

**Стабилизирующие мутации также стабилизируют белок RSV-F из других штаммов и также в процессированном варианте F**

Несколько мутаций, которые демонстрировали высокую экспрессию и значительную стабильность конформации до слияния,

использовали в отношении F-белков RSV из других штаммов (SEQ ID NO 69 и 70) и использовали в отношении варианта F RSV A2 без мутаций в сайте расщепления фурином (F18: SEQ ID NO 71) для оценки являются ли модификации универсальным решением для стабилизации F RSV до слияния (таблица 11).

Таблица 11

Экспрессия и стабильность вариантов A2\_F18 с дополнительными мутациями и F из штамма B1 (SEQ ID NO: 2) и CL57-v224 типа A (SEQ ID NO: 69)

Белок RSV	Seq ID	Относительная* экспрессия (CR9503)	Стабильность** через 5 дней, %
A2_F18	71	0,018	0,0
A2_F18 N67I		0,449	73,2
A2_F18 S215P		0,129	9,1
A2_F18 E487Q		0,006	NA
A2_F18 N67I, S215P	72	0,484	103,4
A2_F18 N67I, E487Q		0,340	92,1
A2_F18 N67I, S215P, E487Q	76	0,355	92,7
A2_F18 N67I, S215P, E92D	78	0,318	96,0
A2_F18 N67I, S215P, D486N	79	0,522	101,3
A2_F18 N67I, S215P, K201N	77	0,643	102,7
A2_F18 N67I, S215P, K66E		0,800	103,0
A2_F18 N67I, S215P, S46G, K66E		0,820	103,5
A2_F18 N67I, S215P, E487Q, K66E		0,704	99,5
A2_F18 N67I, S215P, E92D, K66E		0,905	98,8
A2_F18 N67I, S215P,		0,863	96,6

D486N, K66E			
A2_F18 N67I, S215P, K201N, K66E		1,021	105,5
A2_F18 N67I, S215P, D486N, K66E, I76V		0,594	95,0
B1_ N67I, S215P	73	0,434	90,9
B1_ N67I, S215P петлевой	22	0,552	108,2
CL57v224_ N67I, S215P	74	0,698	94,9
CL57v224_ N67I, S215P петлевой	75	0,615	98,4

Экспрессию белка (концентрация в супернатанте временно трансфицированных клеток) определяли с помощью количественной методики Octet.

\* Относительную экспрессию нормализуют по отношению к экспрессии A2\_F24\_N67I, S215P, E487Q (seq ID #33)

\*\* Стабильность - выражают в виде % концентрации белка, определенного после хранения при 4°C в течение 5 дней, относительно дня сбора клеток. Концентрации определяли с помощью количественной методики Octet с использованием антитела CR9501. NA - данные отсутствуют: связывания CR9501 не выявили.

При введении ранее выявленных точечных мутаций в A2\_F18 (SEQ ID No. 71), стабильность и уровни экспрессии были сопоставимыми с вариантом одноцепочечного F24 (SEQ ID No. 21), который содержал короткую петлю между F1 и F2. Снова наблюдали синергизм, демонстрируя более высокую экспрессию и стабильность при добавлении мутаций к вариантам, которые содержали N67I или двойную мутацию N67I, S215P. Двойная точечная мутация N67I, S215P не только стабилизировала F до слияния штамма A2, но также F до слияния штамма B1 и CL57-v224 (таблица 11).

**Стабилизирующие мутации также стабилизируют полноразмерный белок RSV-F**

Несколько мутаций, которые демонстрировали высокую экспрессию и значительную стабильность конформации до слияния в

растворимой версии RSV-F, соответствующей эктодомену, использовали по отношению к полноразмерному белку RSV-F. Мутации вводили в полноразмерный RSV-F с наличием или без мутаций в сайте отщепления фурином. Ни один домен тримеризации не сливался с этими вариантами (таблица 12).

Экспрессия и стабильность вариантов полноразмерных версий A2\_F18 и A2\_F24 с дополнительными мутациями

		Вариант F-белка RSV*		Свойства	
Аминокислотные замены		SEQ ID No	Линкер F1, F2	Экспрессия, кратность увеличения**	Термостабильность***
Нет (F A2 дикого типа, полноразмерный)		1	Отсутствует	1	-
N67I			Отсутствует	1,4	N.D.
S215P			Отсутствует	1,4	N.D.
E92D			Отсутствует	1,4	N.D.
N67I, K465Q			Отсутствует	1,4	N.D.
N67I, S46G			Отсутствует	0,2	N.D.
N67I, E92D			Отсутствует	1,4	N.D.
N67I, K80E			Отсутствует	2,3	N.D.
N67I, G184N			Отсутствует	1,5	N.D.
N67I, V185N			Отсутствует	1,4	N.D.
N67I, E487Q			Отсутствует	2,5	N.D.
N67I, S215P, V185N			Отсутствует	2,7	N.D.
N67I, S215P, K508E			Отсутствует	3,0	N.D.

N67I, S215P, K80E		Отсутствует	3,1	N.D.
N67I, S215P, K465Q		Отсутствует	2,9	N.D.
N67I, S215P	80	Отсутствует	2,4	++
N67I, S215P, G184N		Отсутствует	7,6	++
N67I, S215P, E92D	82	Отсутствует	6,8	N.D.
N67I, S215P, S46G	88	Отсутствует	6,8	+
N67I, S215P, D486N	86	Отсутствует	5,9	+++
N67I, S215P, E487Q	84	Отсутствует	6,2	N.D.
N67I, S215P, S46G, K66E		Отсутствует	12,1	+++
N67I, S215P, D486N, K66E		Отсутствует	9,2	+++
N67I, S215P, S46G, E92D, K66E		Отсутствует	11,8	+++
N67I, S215P, S46G, E487Q, K66E		Отсутствует	11,0	+++
N67I, S215P, S46G, D486N, K66E		Отсутствует	10,5	+++
N67I, S215P, D486N, K66E, I76V		Отсутствует	7,2	+++
N67I, S215P, S46G, K66E, I76V		Отсутствует	9,7	+++
N67I, S215P, S46G, K80E		Отсутствует	4,5	N.D.
N67I+S215P+G184N+K80E+E92D+E487Q+S46G		Отсутствует	9,1	N.D.
Отсутствует		Q__GSGSG_S	3,8	-
N67I, S215P	81	Q__GSGSG_S	6,2	N.D.
N67I, S215P, G184N		Q__GSGSG_S	7,2	++
N67I, S215P, E92D	83	Q__GSGSG_S	5,9	N.D.

N67I, S215P, S46G	89	Q__GSGSG_S	5,3	++
N67I, S215P, D486N	87	Q__GSGSG_S	5,2	+++
N67I, S215P, E487Q	85	Q__GSGSG_S	4,6	N.D.
N67I, S215P, S46G, K66E		Q__GSGSG_S	11,7	+++
N67I, S215P, D486N, K66E		Q__GSGSG_S	13,8	+++
N67I, S215P, D486N, K66E, I76V		Q__GSGSG_S	6,8	+++
N67I+S215P+G184N+K80E+E92D+E487Q+S46G		Q__GSGSG_S	3,6	N.D.

Уровень экспрессии определяли с помощью FACS. N.D. - не определено. \*все варианты основаны на последовательности F-белка RSV A2. \*\* по сравнению с белком дикого типа кратность увеличения MFI в отношении 9503.

Стабильность определяли с помощью тепловой обработки клеток HEK293T в течение 5-10 минут при 46, 55,3, 60°C.

\*\*\* обозначение для данных стабильности

- снижение связывания до слияния - связывание специфического Mab CR9501 после нагревания до 46°C (например, дикий тип)

+ небольшое снижение связывания CR9501 после нагревания до 46°C, но не в той же степени, как дикого типа

++ без изменения в связывании CR9501 до 60°C включительно, при 60°C некоторое снижение связывания CR9501

+++ без изменения в связывании CR9501 при 60°C

Ранее выявленные стабилизирующие точечные мутации также были стабилизирующими в полноразмерном F-белке. Повышение уровня экспрессии было менее выраженным, но демонстрировало ту же тенденцию. Это может быть вызвано различным фоном, при котором вводили мутации, но причина может также быть в различной методике количественной оценки (FACS по сравнению с вестерн-блоттингом) и биологическим максимумом экспрессии вследствие рециклинга поверхностных белков. Введение связывающей последовательности (или короткой петли) повышало экспрессию и стабильность, и точечные мутации оказывали то же действие. Точечные мутации не были или вряд ли были синергетическими с короткой петлей (подобно тому, как было обнаружено для растворимого белка (таблица 9-11))

Поскольку точечная мутация в положении 67 оказывала такой положительный эффект в отношении уровня экспрессии и стабильности, все аминокислотные замены исследовали в отношении этого положения для изучения того, были ли выбраны наиболее оптимальные положения или можно было бы улучшить эти положения (таблица 13).

Таблица 13

Анализ полной замены экспрессии и стабильности для положения 67 на фоне A2\_F24

Амино-кислотная замена	Относительная экспрессия*	Стабильность** через 4 дня, %	Стабильность** через 10 дня, %
N67A	1,696	0,0	0,0
N67C	1,759	16,7	0,0
N67D	1,702	0,0	0,0
N67E	1,357	0,0	0,0
N67F	2,565	102,2	108,1
N67G	0,853	NA	NA
N67H	1,509	0,0	0,0
N67I	3,773	98,2	102,7
N67K	0,487	NA	NA
N67L	3,609	107,5	96,4

N67M	2,579	87,3	78,7
N67P	2,414	14,3	0,0
N67Q	0,955	NA	NA
N67R	0,523	NA	NA
N67S	1,277	0,0	0,0
N67T	1,577	0,0	0,0
N67V	2,457	84,2	77,0
N67W	1,794	99,9	104,3
N67Y	1,830	61,3	45,8

\* Относительная экспрессия – концентрацию белка определяли с помощью метода количественного октета с использованием антитела CR9503 и экспрессию по отношению к концентрации A2\_F24 (SEQ ID #19)

\*\* Стабильность – выражают в виде % концентрации белка, определенного после хранения при 4°C в течение 5 и 10 дней, относительно дня сбора клеток. Концентрации определяли с помощью количественной методики Octet с использованием антитела CR9501. NA – данные отсутствуют: связывания CR9501 не выявили.

Как представлено в таблице 13, преимущественно гидрофобные остатки и, в частности, Ile, Leu и Met в положении 67 могли повышать экспрессию и стабильности. Ile представляет собой остаток, который в наибольшей степени повышал экспрессию и стабильность. Остатки Glu и Gln, самый маленький остаток Gly и положительно заряженные остатки Arg и Lys обладали наибольшим дестабилизирующим эффектом в положении 67 в отношении конформации до слияния.

В соответствии с настоящим изобретением мутации аминокислот, которые стабилизируют конформацию F-белка RSV до слияния, можно группировать в различные категории, которые стабилизируют конформацию различным образом. Стратегии для стабилизации F до слияния основаны на модели гомологии RSV-F, которая была основана на кристаллической структуре PIV5 (Yin et. al., 2006) и выравнивании на странице 27.

Аминокислотные остатки 67 и 215

Аминокислотные остатки в положениях 67 и 215 являются очень близкими по 3D структуре модели до слияния и кристаллической структуре после слияния. Остатки являются близкими по консервативному дисульфидному мостику в верхней части участка DIII, который образует шарнир, по которому участок HRA подвергается рефолдингу в удлиненный суперспиральный растянутый спиральный тример. Мутации в этом участке будут влиять на функцию шарнира и, таким образом, мутации, которые были введены, стабилизируют конформацию до слияния с помощью блокады шарнирной функции.

#### Аминокислотные остатки 77, 80

Аминокислотные остатки в положениях 77 и 80 расположены в длинной спирали (остатки 76-98) на С-конце F2, который находится в непосредственном контакте с группой вторичных структур в DIII на N-конце F1, который подвергается рефолдингу в длинную суперспиральную структуру конформации после слияния. Поскольку эти два участка подлежат разделению во время рефолдинга с конформации до слияния в конформацию после слияния, аминокислоты в этом участке, которые предотвращают это разделение, стабилизировали бы конформацию до слияния. Поскольку эти два участка должны разделяться во время рефолдинга, некоторые из остатков можно оптимизировать для усиления взаимодействия. Примером отталкивания, которое наблюдалось, являлось отталкивание между положительно заряженным Lys80. Мутация Lys80 до отрицательно заряженного остатка Glu повышала экспрессию F до слияния. Вследствие последовательного перехода к конформации после слияния, эти мутации можно комбинировать с другими стабилизирующими мутациями, например, N67I и S215P, для получения полного эффекта этой стабилизации, как показано в таблице 10.

#### Аминокислотный остаток 92

Аминокислотный остаток в положении 92 также расположен в длинной спирали (остатки 76-98) на С-конце F2, который находится в непосредственном контакте с группой вторичных структур в DIII на N-конце F1, который подвергается рефолдингу в длинную суперспиральную структуру конформации после слияния.

При отделении спирали от участка HRA, он передвигается к участку DIII, который содержит эпитоп Synagis (эпитоп II) (Arbiza et al., J. Gen. Virol. 73:2225-2234, 1992), и отрицательно заряженный Glu92 перемещается очень близко к положительно заряженному Arg282 в положении после конформации. Мутации, которые уменьшают это перемещение, будут стабилизировать конформацию до слияния. Мутация Glu92 в консервативный остаток Asp будет уменьшать перемещение, поскольку он не сможет достигнуть Arg282.

#### Аминокислотные остатки 486, 487

Аминокислотные остатки 486, 487 и 489 в верхней части HRB в конформации до слияния создают мутацию отрицательно заряженного фрагмента Glu487 в Asn или Ile, повышающую экспрессию F до слияния. Мутации Asp486 в Asn или Gln и/или Glu489 в Asn, Ile или Gln будут иметь такой же самый эффект. Вследствие последовательного перехода к конформации после слияния, эти мутации можно комбинировать с другими стабилизирующими мутациями, например, N67I и S215P, для получения полного эффекта этой стабилизации, как показано в таблице 10, например, D486N.

#### Аминокислотные остатки 175, 184, 185

Для рефолдинга от конформации до слияния в конформацию после слияния участок между остатком 175 и 193 необходимо преобразовать от петли - бета-шпильки в спираль.

Этот участок демонстрирует наиболее существенный структурный переход. Часть этого участка фактически имеет наиболее высокую степень прогнозирования образования альфа-спирали. Фактические спиральные структуры в модели до слияния представлены ниже выделением серого цвета. Весь данный участок преобразуется в одну большую спираль, когда он подвергается рефолдингу в конформацию после слияния. В нижней последовательности остатки выделены серым цветом с наиболее высокой степенью прогнозирования образования спирали на основе Agadir (<http://agadir.crg.es/>). Из этого сравнения ясно, что C-концевая часть, которая сохраняется в бета-шпильке в конформации до слияния (остатки 187-202), имеет высокую

склонность к образованию альфа-спильки.

150 160 170 180 190 200 210

SGVAVSKVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSLN**GVSVLTSKV**LDLKNYIDK**QLLP**IVNKQSC  
 hhhhhh hhhhhh hhhh ssssss ssssss hhhhhh

SGVAVSKVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSLN**GVSVLTSKV**LDLKNYIDK**QLLP**IVNKQSC

Последовательность остатков 150-212 RSV-F представлена выше. На второй строке вторичные структуры верхней строки указаны с помощью h (для спирали) и s (для нитей) на основании 3D модели гомологии PIV-5. Спирали выделены серым затенением. Нижняя строка является той же самой последовательностью, в которой спирали затенены серым цветом, на основе свойств спирали последовательности.

Таким образом, пролин вводили в положение 175 для стабилизации этого поворота и для предотвращения рефолдинга в спираль, которая в качестве единичной мутации повысила уровень экспрессии, указывая, что она стабилизирует конформацию до слияния и обеспечивает лучший процессинг белка. Для поворота в шпильке (остатки 184, 185) в базе данных Brookhaven проводили поиск в отношении структурно гомологичной шпильки от стабильного белка, который не подвергается рефолдингу. Была обнаружена высокая структурная гомология с петлей шпильки в протеинкиназе А (код pdb 3FHI). В соответствии с выравниванием, представленным ниже, остатки 184 Gly или 185Val замещали Asn для того, чтобы стабилизировать этот поворот и предотвратить его рефолдинг.

VVSLN**GVSVLTSKV** HRAb1b2 178-192

EMDVYV**NNEW**ATSVG 3fhi:B 179-193

Эти мутации можно комбинировать с другими стабилизирующими мутациями, например, N67I и S215P, для получения полного эффекта этой стабилизации, как показано в таблице 10.

#### Аминокислотные остатки 421, 426 и 46

Аминокислотные остатки в положениях 421 и 426 расположены в петле в участке DII. Остаток S46 расположен на нити, которая переходит от DI к DIII. Аминокислотный остаток в положении 426 подвергали мутации в серин и аминокислотный остаток в положении 46 подвергали мутации в глицин. Эти мутации повышали

стабильность и уровни экспрессии до слияния.

#### Аминокислотный остаток 465

Аминокислотный остаток Lys465 расположен в другом участке, который проходит через большое конформационное изменение. Lys465 расположен на перекрещенной петле, которая связывает верхнюю часть участка DII с HRB. Поскольку участок HRB движется от нижней части к верхней части и образует комплексы с HRA для образования пучка из шести спиралей, перекрещенная петля также перемещается с верхней части в нижнюю часть. Эта петля должна, таким образом, быть метастабильной для обеспечения отделения DII и смены положения в другом окружении. Lys465 на перекрещенной петле расположен непосредственно рядом с Lys445 на участке DII. Мутация Lys465 в Gln или Glu нейтрализует отталкивание и повышало стабильность и уровни экспрессии F до слияния.

#### ПРИМЕР 3

##### **Экспрессия F-белка до слияния**

Плазмиды экспрессии, кодирующие рекомбинантный F-белок RSV до слияния, создавали с помощью стандартных способов, широко известных в данной области, включая сайт-направленный мутагенез и ПЦР. Используемой системой для экспрессии были клетки 293Freestyle (Life Technologies, Ренфрушир, Великобритания). Клетки временно трансфицировали с помощью 293Fectin (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя и культивировали во встряхивателе-инкубаторе в течение 5 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 фильтровали в стерильных условиях с помощью 0,22 мкм вакуумного фильтра и хранили при 4°C до использования.

#### ПРИМЕР 4

##### **Очистка F-белка RSV до слияния**

Рекомбинантные полипептиды очищали с помощью 2-стадийного протокола очистки с применением катион-обменной колонки для первичной очистки, а затем колонки superdex200 для завершающей

стадии с удалением остаточных примесей. Для исходного ионообменной стадии супернатант культуры разбавляли 2 объемами по 50 мМ NaOAc, pH 5,0, и пропускали через 5 мл колонку HiTrap Capto S при скорости 5 мл в минуту. Затем колонки отмывали 10 объемами, соответствующими объему колонки (CV), по 20 мМ NaOAc, 50 мМ NaCl, 0,01% (об./об.) tween20, pH 5 и элюировали 2 CV по 20 мМ NaOAc, 1М NaCl, 0,01% (об./об.) tween20, pH 5. Элюат концентрировали с помощью концентратора-центрифуги, а затем белок очищали с помощью колонки superdex200 с использованием 40 мМ Tris, 500 мМ NaCl, 0,01% (об./об.) tween20, pH 7,4, в качестве подвижного буфера. На фигуре 1А представлена хроматограмма с гель-фильтрационной колонки и главный пик содержит F-белок RSV до слияния. Фракции, содержащие этот пик, снова объединяли и концентрацию белка определяли при OD280 и сохраняли при 4°C до использования. На фигуре 1В представлен сокращенный результат анализа SDS-PAGE конечного препарата белка, и можно видеть, что чистота составляла >95%. Идентичность полосы подтверждали с помощью вестерн-блоттинга и специфических к F-белку антител (не показано).

#### ПРИМЕР 5

##### **NativePAGE**

Для исходного определения мультимерного состояния F-полипептидов до слияния в соответствии с настоящим изобретением супернатанты культур от временно трансфицированных клеток анализировали в гель-системе NativePAGE Bis-Tris (Life Technologies). Затем гели подвергали блоттингу с использованием iBlot technolog в соответствии с инструкциями производителя (Life Technologies). Антитело CR9503, специфичное к F-белку RSV (последовательность приведена ниже в таблице 17), использовали в качестве первичного зонда для выявления F-белка RSV до слияния, а затем использовали HRP-конъюгированное мышинное антитело к IgG человека (Jackson ImmunoResearch, Вест Гров, Пенсильвания) или IRDye800CW-конъюгированное аффинно очищенное антитело к IgG человека (кроличье) (Rockland Immunochemicals, Гилбертсвилл, Пенсильвания). Блоты проявляли с использованием

стандартной пленки (Codak) или с использованием инфракрасной системы для визуализации Odyssey CLx. На фигуре 2 представлен анализ NativePAGE супернатантов от мономерного F47- (линия 1), F-белка RSV после слияния и первично тримерного F-белка RSV (линия 2) и очищенного F-белка RSV до слияния (линия 3), показывающий, что после очистки только тримерные молекулы присутствуют в препарате F-белка RSV до слияния, поскольку он мигрирует подобным образом к тримерной полосе после слияния. Это также подтверждается объемом элюирования из гель-фильтрационной колонки (фигура 1A).

#### ПРИМЕР 6

##### **Количественный вестерн-блоттинг**

Для количественного определения конструкций F-белка RSV до слияния использовали количественный вестерн-блоттинг. Разбавления супернатантов культур прогоняли в 4-12% (вес/объем) градиентных гелях Bis-Tris NuPAGE (Life Technology) и проводили блоттинг с помощью технологии iBlot (Life Technology). Блоты инкубировали с CR9503 (как описано выше) и проявляли с использованием конъюгированного мышиного антитела к IgG человека (Jackson ImmunoResearch, Вест Гров, Пенсильвания) или IRDye800CW-конъюгированного аффинно очищенного антитела к IgG человека (кроличье) (Rockland Immunochemicals, Гилбертсвилл, Пенсильвания). Количества белка затем определяли с помощью серии разбавлений очищенного стандартного белка RSV или с использованием системы инфракрасной визуализации Odyssey CLx или на глаз. На фигуре 3 можно увидеть эффекты по отношению к конструкции A2\_F24 (SEQ ID NO: 19) по показателю общих уровней экспрессии. Было показано, что единичные мутации повышали уровень экспрессии до 5 раз. Если создавали двойные мутанты по некоторым из этих мутаций, то могли наблюдаться синергетические эффекты и в некоторых случаях дополнительное повышение экспрессии до 11 раз по сравнению с A2\_F24.

#### ПРИМЕР 7

##### **Анализ конечной стабильности**

Подтверждение конформации до слияния экспрессируемых полипептидов в соответствии с настоящим изобретением выполняли

с помощью технологии интерферометрии BioLayer (Octet) с использованием специфичных антител CR9501 или CR9502 до слияния, или неконформационного специфического антитела CR9503, которое содержит переменные участки тяжелой и легкой цепи мотаивизумаба. Антитела биотинилировали с помощью стандартных протоколов и иммобилизовали на стрептавидиновых биосенсорах (ForteBio, Портсмут, Великобритания). Процедура заключалась в следующем. После уравнивания сенсоров в кинетическом буфере (ForteBio) в течение 60 секунд наконечники переносили в PBS с 5 мкг/мл предпочтительного антитела. Загрузку проводили в течение 250 секунд. Затем включали другую стадию уравнивания в течение 200 секунд в кинетическом буфере. В конечном итоге наконечники переносили в супернатант культуры для экспрессии, содержащий F-полипептиды RSV до слияния и записывали ответ связывания (нм) через 1200 секунд. Эта фаза также обозначается как фазовая ассоциация. Это выполняли непосредственно после сбора клеток (1 день), а также спустя 5 дней (5 день), и разницу в связывании CR9501 использовали в качестве скринингового средства для выявления мутаций, способных стабилизировать конформацию до слияния. Конструкцию считали стабильной, если наблюдали менее 20% потери связывания на 5 день, а если наблюдали менее 20% потери связывания, ее считали нестабильной. Стабильные конструкции затем подвергали более строгому исследованию при необходимости. Анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения ForteBio Data Analysis 6.4 (ForteBio).

#### ПРИМЕР 8

##### **Анализ термостабильности**

Стабилизирующий потенциал введенных характеристик в F-полипептиды RSV определяли по тепловому стрессу. Для этой цели супернатант культур от временно трансфицированных клеток или очищенный белок нагревали с использованием диапазона температур. Образцы затем охлаждали на льду для предотвращения дополнительных индуцированных теплом конформационных изменений и инкубировали с антителом CR9501 в системе по технологии Octet, как описано в примере 7. Ответы, полученные в конце

фазовой ассоциации при различных температурах, изображали на графике в виде функции температуры и приближали с помощью нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения Prism. Это приводило к определению температуры, где уровень связывания антител составляет 50% от максимума и эту величину можно было использовать для сравнения различных конструкций в отношении термостабильности до слияния. На фигуре 4 сравнивают немодифицированный эктодомен (SEQ ID NO: 13) и конструкцию A2\_F24 N67I+S215P (SEQ ID NO: 21). Можно заметить, что индуцированный температурой стресс оказывал меньший эффект на конструкцию A2\_F24 N67I+S215P (SEQ ID NO: 21) по сравнению с немодифицированным эктодомом. Таким образом, можно сделать заключение, что стабилизирующие мотивы, введенные в полипептиды в соответствии с настоящим изобретением, т.е. сайт тримеризации, линкер F1-F2 и 2 точечные мутации, приводили к более стабильному F-белку до слияния.

#### ПРИМЕР 9

##### **Анализ стабильности фазовой ассоциации**

Для определения стабильности различных точечных мутаций использовали анализ связывания Octet, разновидность ранее описанного анализа конечной стабильности (пример 7). Анализ фазовой ассоциации выполняли вследствие очень высоких уровней экспрессии некоторых точечных мутантов, поскольку он более строгий и полностью предотвращает смещение уровня экспрессии. Также использовали антитело CR9501, однако, вместо выбора связывающего ответа в конце фазовой ассоциации использовали всю кривую ассоциации для снижения потенциального смещения концентраций конечного анализа. Это выполняли с использованием значений из всей фазовой ассоциации эксперимента с помощью указанных точечных мутаций A2\_F24. Данные восполняли за счет количества связанного антитела на чипе. Измерения выполняли в 1, 5 и 33 дни, и сравнивали формы кривых по этим трем дням. Если получали идентичные кривые, то конструкцию считали стабильной, а если нет, то нестабильной. На фигуре 5 можно увидеть анализ четырех различных вариантов. Нестабильные белковые конструкции до слияния можно выявить с помощью

зависимой от времени потери связывания CR9501 (A2\_F24, K465Q, S46G), в то время как стабильные конструкции до слияния (N67I) не демонстрировали такого снижения. Мутация E92D, по-видимому, попадала в группу между двумя мутациями, имеющими промежуточную стабильность, поскольку наблюдали лишь незначительные изменения в форме кривой. На фигуре 6 выбранные точечные мутации комбинировали для получения двойных мутантов и их анализировали. Как можно увидеть, различные мутации проявляли различные фенотипы в отношении стабильности и индуцирования стабильности. Если полипептиды содержат мутации K465Q или S46G по отдельности или в комбинации, все трое, т.е. два единичный и двойной мутанты, являются нестабильными и связывание специфического антитела до слияния со временем теряется. Если мутацию S46G комбинируют с E92D, которая ранее, как было показано, имеет промежуточную стабильность в виде единичной мутации, изменения стабильности могло не наблюдаться, указывая, что мутация E92D не может корректировать нестабильные белковые конструкции. Если мутацию N67I комбинировали с мутацией S46G или E92D, то результатом была полностью стабильная конструкция. Это могло также наблюдаться, если мутацию S215P комбинировали с мутацией E92D, показывая уникальный потенциал этих двух мутаций для стабилизации нестабильных конструкций до слияния.

#### ПРИМЕР 10

##### **Количественный анализ с использованием Octet**

Для определения концентрации F-белка RSV в супернатантах клеточных культур использовали количественный метод на основе Octet. Антитела CR9501 и CR9503 биотинилировали с помощью стандартных протоколов и иммобилизовали на стрептавидиновых биосенсорах (ForteBio, Портсмут, Великобритания). После этого покрытые биосенсоры блокировали в супернатанте ложно-трансфицированных клеточных культур. Количественный эксперимент выполняли следующим образом: температура 30С, скорость встряхивания 1000 об./мин, время анализа 300 секунд. Концентрацию белка в супернатанте клеточной культуры рассчитывали с помощью стандартной кривой. Стандартную кривую получали для каждого покрытого антитела с использованием белка

A2\_F24\_N67I+S215P (SEQ ID# 21), разбавленного в супернатанте ложно-трансфицированных клеточных культур. Измерения проводили в день сбора супернатанта (1 день) и после хранения супернатанта при 4°C в течение 5 дней или дольше. Разницу в концентрации, определенную с помощью CR9501, использовали в качестве скринингового средства для выявления мутаций, способных к стабилизации конформации до слияния. Конструкция считалась стабильной, если наблюдалось менее, чем 20% снижение определяемой концентрации на 5 день. Анализ данных выполняли с помощью компьютерной программы ForteBio Data Analysis 6.4 (ForteBio).

#### ПРИМЕР 11

##### **Анализ FACS и термостабильность**

Плазмиды экспрессии, кодирующие рекомбинантный полноразмерный F-белок RSV, создавали с помощью стандартных способов, широко известных в данной области, включая сайт-направленный мутагенез и ПЦР. Клетки HEK293-T временно трансфицировали с помощью 293Fectin (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя и культивировали в течение 48 часов при 37°C и 10% CO<sub>2</sub>. Клетки отделяли от чашек для культивирования с помощью буфера FACS (5 mM EDTA, 1% FBS в PBS), отмывали и ресуспендировали в том же буфере. Клетки окрашивали в отношении поверхностного F-белка RSV с использованием биотинилированных антител CR9501 или CR9503, с последующим окрашиванием APC-меченым стрептавидином. Для дифференцировки живых и мертвых клеток пропидия йодид добавляли в суспензию клеток в конце процедуры окрашивания. Клетки анализировали на FACS Canto (BD Biosciences) в соответствии со стандартными способами, хорошо известными любому специалисту в данной области. Анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения FlowJo 9.0 (Tree Star Inc.). Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) рассчитывали для популяции живых APC-положительных клеток.

Стабилизирующий потенциал введенных характеристик в полноразмерный мембранно-связанный F RSV определяли по

тепловому стрессу. Через 48 часов после трансфекции клетки отделяли от чашек культивирования, как описано выше, и суспензию клеток нагревали в течение 5-10 минут с использованием диапазона температур (37, 46, 55,3, 60°C). Клетки затем окрашивали и анализировали с помощью FASC, как описано выше. MFI рассчитывали для популяции живых APC-положительных клеток. Процент APC-положительных клеток рассчитывали для популяции живых клеток. Окрашивание с помощью CR9503 приводило к подобным MFI и % APC-положительных клеток в образцах, подвергнутых тепловому шоку возрастающими температурами. Окрашивание с помощью CR9501 уменьшало образцы клеток, трансфицированных нестабильными белками. Потеря связывания CR9501 указывала на потерю F-белка RSV до слияния на поверхности клетки.

#### ПРИМЕР 12

##### **Доклиническая оценка иммуногенности F до слияния**

Для определения иммуногенности стабилизированного F RSV до слияния (A2F24, N67I, S215P) (SEQ ID NO: 21) мышей иммунизировали в соответствии с таблицей 14 0,5 или 5 мкг в прайм-бустерном режиме на 0 неделе и на 4 неделе. Как представлено на фигуре 7, мыши, иммунизированные F до слияния, демонстрировали более высокие титры VNA, чем мыши, иммунизированные F после слияния RSV.

Таблица 14

Схема иммунизации

Группа	Препарат	Доза	Адъювант	N
1	F после слияния	0,5 мкг	-	9
2	F после слияния	5 мкг	-	9
3	F до слияния	0,5 мкг	-	9
4	F до слияния	5 мкг	-	9
5	F после слияния	0,5 мкг	Поли (I:C)	9
6	F до слияния	0,5 мкг	Поли (I:C)	9
8	FI-RSV	1/75	-	8
9	PBS		-	3

Затем хлопковых крыс иммунизировали двумя различными дозами RSV-F в конформации после слияния и до слияния (таблица 15). Животных иммунизировали i.m. на 0 неделе и 4 неделе. На фигуре 8 представлены высокие титры нейтрализующих антител в день контрольного заражения (7 неделя).

Таблица 15

Группы, иммуноген и доза для определения иммуногенности и эффективности у хлопковых крыс

Группа	Препарат	Доза	Адъювант
1	F после слияния	0,5 мкг	-
2	F после слияния	5 мкг	-
3	F до слияния	0,5 мкг	-
4	F до слияния	5 мкг	-
9	F до слияния	0,5 мкг	Поли IC
10	F до слияния	5 мкг	Поли IC
11	F до слияния	0,5 мкг	Фосфатный адъювант
12	F до слияния	5 мкг	Фосфатный адъювант
13	Ad26.RSV.F <sub>A2</sub>	10 <sup>8</sup>	-
14	PBS	-	-

Вирусную нагрузку в легких и носу определяли через пять дней после контрольного заражения (смотри фигуру 9).

Показано, что F-полипептиды до слияния в соответствии с настоящим изобретением способны индуцировать мощный иммунный ответ, который снижал вирусную нагрузку в легких и даже в носу.

Таблица 16

Стандартные аминокислоты, аббревиатуры и свойства

Аминокислота	3- буквенная	1- буквенная	Полярность боковой цепи	Заряд боковой цепи (pH 7,4)
Аланин	Ala	A	Неполярная	Нейтральный
Аргинин	Arg	R	Полярная	Положительный
Аспарагин	Asn	N	Полярная	Нейтральный
Аспарагиновая кислота	Asp	D	Полярная	Отрицательный

Цистеин	Cys	C	Неполярная	Нейтральный
Глутаминовая кислота	Glu	E	Полярная	Отрицательный
Глутамин	Gln	Q	Полярная	Нейтральный
Глицин	Gly	G	Неполярная	Нейтральный
Гистидин	His	H	Полярная	Положительный (10%) Нейтральный (90%)
Изолейцин	Ile	I	Неполярная	Нейтральный
Лейцин	Leu	L	Неполярная	Нейтральный
Лизин	Lys	K	Полярная	Положительный
Метионин	Met	M	Неполярная	Нейтральный
Фенилаланин	Phe	F	Неполярная	Нейтральный
Пролин	Pro	P	Неполярная	Нейтральный
Серин	Ser	S	Полярная	Нейтральный
Треонин	Thr	T	Полярная	Нейтральный
Триптофан	Trp	W	Неполярная	Нейтральный
Тирозин	Tyr	Y	Полярная	Нейтральный
Валин	Val	V	Неполярная	Нейтральный

## Последовательности антител

Антитело	Домен VH	CDR1 VH	CDR2 VH	CDR3 VH
CR9501	Аминокислоты 1-125 с SEQ ID NO: 53	GASINSDNYYWT (SEQ ID NO:54)	HISYTGNTYYTPSLKS (SEQ ID NO:55)	CGAYVLISNCGWFDS (SEQ ID NO:56)
CR9502	Аминокислоты 1-121 с SEQ ID NO: 57	GFTFSGHTIA (SEQ ID NO:58)	WVSTNNGNTEYAQKIQG (SEQ ID NO:59)	EWLVMGGFAFDH (SEQ ID NO:60)

Антитело	Домен VL	CDR1 VL	CDR2 VL	CDR3 VL
CR9501	Аминокислоты 1-107 SEQ ID NO: 61	QASQDISTYLN (SEQ ID NO: 62)	GASNLET (SEQ ID NO:63)	QQYQYLPYT (SEQ ID NO:64)
CR9502	Аминокислоты 1-110 SEQ ID NO: 65	GANNIGSQNVH (SEQ ID NO:66)	DDRDRPS (SEQ ID NO:67)	QVWDSSRDQAVI (SEQ ID NO:68)

Аминокислотная последовательность нескольких конструкций F RSV до слияния приведена ниже. Следует отметить, что нумерация аминокислот в различных конструкциях, описанных в данном документе, основана на последовательности дикого типа (SEQ ID NO: 1), которая означает, что все аминокислоты с 1 положения до 108 положения включительно конструкций до слияния соответствуют положениям аминокислот 1-108 последовательности дикого типа, где нумерация аминокислот с 138 положения до конца смещена на 22 аминокислоты, т.е. L138 в последовательности дикого типа (SEQ ID NO: 1) соответствует L116 во всех конструкциях до слияния. Это связано с тем фактом, что была выполнена делеция в конструкциях до слияния, т.е. вставка линкера GSGSG, при этом фактическая нумерация F1 не является одинаковой между конструкциями. Таким образом, нумерация, используемая по отношению к специфическим мутациям в соответствии с настоящим изобретением, например, S215P, относится к положению аминокислоты в последовательности дикого типа.

#### **Последовательности**

**Полноразмерная последовательность F-белка RSV A2 (SEQ ID NO: 1)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKNKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVT  
 LSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKV  
 LDLKNYIDKQLLPVIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSE  
 LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP  
 LCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNV  
 DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVD  
 TVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL  
 LHNVNAVKSTTNIMITTIIIVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

**Полноразмерная последовательность F-белка RSV B1 (SEQ ID NO: 2)**

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KETKCNNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARREAPQYMYNTINTTKNLNVS  
 ISKKRKRKRRFLGFLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKV  
 LDLKNYINNQLLPVIVNQSCSISNIETVIEFQQKNSRLLLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSE  
 LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSP

LCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLTPSEVSLCNT  
 DIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVD  
 TVSVGNTLYYVKNLEGKNLYVKGEPI INYYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDEL  
 LHNVTGKSTTNIMITTIIIVIIVVLLSLIAIGLLLYCKAKNTPVTLTKDQLSGINNIAFSK

**SEQ ID NO: 3**

EKKIEAIEKKIEAIEKKIEA

**SEQ ID NO: 4**

GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

**SEQ ID NO: 5**

GSGSG

**F8: RSV A2, эктодомен дикого типа (SEQ ID NO: 13)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKNKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVT  
 LSKKRKRRFLGFLGVSIAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKV  
 LDLKNYIDKQLLP IVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSE  
 LLSLINDMPITNDQKLMSSNVQIVRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP  
 LCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLTPSEVNLCNV  
 DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVD  
 TVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL  
 LHHHHHHHH

**F11: RSV B1, эктодомен дикого типа (SEQ ID NO: 14)**

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNI TEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARREAPQYMNNTINTTKNLNVS  
 ISKKRKRRFLGFLGVSIAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKV  
 LDLKNYINNQLLP IVNQSCRISNIETVIEFQQKNSRLEINREFSVNAGVTPPLSTYMLTNSE  
 LLSLINDMPITNDQKLMSSNVQIVRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSP  
 LCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLTPSEVSLCNT  
 DIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVD  
 TVSVGNTLYYVKNLEGKNLYVKGEPI INYYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDEL  
 LHHHHHHHH

**F47: RSV A2, стабилизированный линкером, IZ(S) (SEQ ID NO: 15)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKNKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVSIAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP IVNKQSCSIS  
 NIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKLMSSNVQ

QIVRQQSYSIMSIIKKEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVEKKIEAIEKKIEAIEKKIEAGGIEGRHHHHHHH

**F47-: RSV A2, стабилизированный линкером, IZ(S) (SEQ ID NO: 16)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKNKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVSIAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLT SKVLDLKNYIDKQLLPVFNKQSCSI  
 SNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKKEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVEKKIEAIEKKIEAIEKKIEAGG

**F43: RSV B1, стабилизированный линкером, IZ(S) (SEQ ID NO: 17)**

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNI TEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLGFLLGVSIAIAS  
 GIAVSKVLHLEGEVNIKNALLSTNKAVVSLNNGVSVLT SKVLDLKNYINNQLLPVFNQQSCRI  
 SNIETVIEFQQKNSRLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKKEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKLEGKNLYVK  
 GEPIINYYDPLVFPSEDFDASISQVEKKIEAIEKKIEAIEKKIEAGGIEGRHHHHHH

**F24: RSV B1, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 18)**

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNI TEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLGFLLGVSIAIAS  
 GIAVSKVLHLEGEVNIKNALLSTNKAVVSLNNGVSVLT SKVLDLKNYINNQLLPVFNQQSCRI  
 SNIETVIEFQQKNSRLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKKEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKLEGKNLYVK  
 GEPIINYYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGRHHHHHH

**A2\_F24: RSV A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID**

**NO: 19)**

MELLILKANAI T T I L T A V T F C F A S G Q N I T E E F Y Q S T C S A V S K G Y L S A L R T G W Y T S V I T I E L S N I  
 K K N K C N G T D A K I K L I K Q E L D K Y K N A V T E L Q L L M Q S T P A T N N Q A R G S G S G R S L G F L L G V G S A I A S  
 G V A V S K V L H L E G E V N K I K S A L L S T N K A V V S L S N G V S V L T S K V L D L K N Y I D K Q L L P I V N K Q S C S I  
 S N I E T V I E F Q Q K N R L L E I T R E F S V N A G V T T P V S T Y M L T N S E L L S L I N D M P I T N D Q K K L M S N N V  
 Q I V R Q Q S Y S I M S I I K E E V L A Y V V Q L P L Y G V I D T P C W K L H T S P L C T T N T K E G S N I C L T R T D R G W Y  
 C D N A G S V S F F P Q A E T C K V Q S N R V F C D T M N S L T L P S E V N L C N V D I F N P K Y D C K I M T S K T D V S S S V  
 I T S L G A I V S C Y G K T K C T A S N K N R G I I K T F S N G C D Y V S N K G V D T V S V G N T L Y Y V N K Q E G K S L Y V K  
 G E P I I N F Y D P L V F P S D E F D A S I S Q V N E K I N Q S L A F I R K S D E L L S A I G G Y I P E A P R D G Q A Y V R K D  
 G E W V L L S T F L G G I E G R

**F24-: RSV B1, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 20)**

MELLIHRLSAI F L T L A I N A L Y L T S S Q N I T E E F Y Q S T C S A V S R G Y F S A L R T G W Y T S V I T I E L S N I  
 K E T K C N G T D T K V K L I K Q E L D K Y K N A V T E L Q L L M Q N T P A A N N Q A R G S G S G R S L G F L L G V G S A I A S  
 G I A V S K V L H L E G E V N K I K N A L L S T N K A V V S L S N G V S V L T S K V L D L K N Y I N N Q L L P I V N Q Q S C R I  
 S N I E T V I E F Q Q K N S R L L E I N R E F S V N A G V T T P L S T Y M L T N S E L L S L I N D M P I T N D Q K K L M S S N V  
 Q I V R Q Q S Y S I M S I I K E E V L A Y V V Q L P I Y G V I D T P C W K L H T S P L C T T N I K E G S N I C L T R T D R G W Y  
 C D N A G S V S F F P Q A D T C K V Q S N R V F C D T M N S L T L P S E V S L C N T D I F N S K Y D C K I M T S K T D I S S S V  
 I T S L G A I V S C Y G K T K C T A S N K N R G I I K T F S N G C D Y V S N K G V D T V S V G N T L Y Y V N K L E G K N L Y V K  
 G E P I I N Y D P L V F P S D E F D A S I S Q V N E K I N Q S L A F I R R S D E L L S A I G G Y I P E A P R D G Q A Y V R K D  
 G E W V L L S T F L G G I E G R

**A2\_F24 N67I+S215P: A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 21)**

MELLILKANAI T T I L T A V T F C F A S G Q N I T E E F Y Q S T C S A V S K G Y L S A L R T G W Y T S V I T I E L S N I  
 K K I K C N G T D A K I K L I K Q E L D K Y K N A V T E L Q L L M Q S T P A T N N Q A R G S G S G R S L G F L L G V G S A I A S  
 G V A V S K V L H L E G E V N K I K S A L L S T N K A V V S L S N G V S V L T S K V L D L K N Y I D K Q L L P I V N K Q S C S I  
 P N I E T V I E F Q Q K N R L L E I T R E F S V N A G V T T P V S T Y M L T N S E L L S L I N D M P I T N D Q K K L M S N N V  
 Q I V R Q Q S Y S I M S I I K E E V L A Y V V Q L P L Y G V I D T P C W K L H T S P L C T T N T K E G S N I C L T R T D R G W Y  
 C D N A G S V S F F P Q A E T C K V Q S N R V F C D T M N S L T L P S E V N L C N V D I F N P K Y D C K I M T S K T D V S S S V  
 I T S L G A I V S C Y G K T K C T A S N K N R G I I K T F S N G C D Y V S N K G V D T V S V G N T L Y Y V N K Q E G K S L Y V K  
 G E P I I N F Y D P L V F P S D E F D A S I S Q V N E K I N Q S L A F I R K S D E L L S A I G G Y I P E A P R D G Q A Y V R K D  
 G E W V L L S T F L G G I E G R

**F24-N67I+S215P: RSV B1, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 22)**

MELLIHRLSAI F L T L A I N A L Y L T S S Q N I T E E F Y Q S T C S A V S R G Y F S A L R T G W Y T S V I T I E L S N I  
 K E I K C N G T D T K V K L I K Q E L D K Y K N A V T E L Q L L M Q N T P A A N N Q A R G S G S G R S L G F L L G V G S A I A S

GIAVSKVLHLEGEVNIKNALLSTNKAVVSLNNGVSVLTISKVLDLKNYINNQLLP IVNQQSCRI  
 PNIETVIEFQQKNSRLLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKLEGKNLYVK  
 GEPIINYYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+E92D: RSV A2, стабилизированный линкером,  
 фибритин (SEQ ID NO: 23)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVGSIAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTISKVLDLKNYIDKQLLP IVNKQSCSI  
 SNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTVPSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**F24- N67I+E92D RSV B1, стабилизированный линкером, фибритин  
 (SEQ ID NO: 24)**

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNI TEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KEIKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLGFLLGVGSIAIAS  
 GIAVSKVLHLEGEVNIKNALLSTNKAVVSLNNGVSVLTISKVLDLKNYINNQLLP IVNQQSCRI  
 SNIETVIEFQQKNSRLLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKLEGKNLYVK  
 GEPIINYYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+K465Q RSV A2, стабилизированный линкером,  
 фибритин (SEQ ID NO: 25)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTE LQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVGSIAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTISKVLDLKNYIDKQLLP IVNKQSCSI  
 PNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTTVPSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY

CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGQSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWLLSTFLGGIEGR

**F24- N67I+K465Q RSV B1, стабилизированный линкером, фибритин  
 (SEQ ID NO: 26)**

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNI TEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KEIKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLGFLLGVSIAIAS  
 GIAVSKVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLNNGVSVLT SKVLDLKNYINNQLLP IVNQSCRI  
 PNIETVIEFQQKNSRLLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNV  
 QIVRQOQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKLEGQONLYVK  
 GEPIINYYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+S46G RSV A2, стабилизированный линкером,  
 фибритин (SEQ ID NO: 27)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKI KCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVSIAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLT SKVLDLKNYIDKQLLP IVNKQSCSI  
 SNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNV  
 QIVRQOQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWLLSTFLGGIEGR

**F24- N67I+S46G RSV B1, стабилизированный линкером, фибритин  
 (SEQ ID NO: 28)**

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNI TEEFYQSTCSAVSRGYFGALRTGWYTSVITIELSNI  
 KEIKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLGFLLGVSIAIAS  
 GIAVSKVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLNNGVSVLT SKVLDLKNYINNQLLP IVNQSCRI  
 SNIETVIEFQQKNSRLLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNV  
 QIVRQOQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKLEGKNLYVK  
 GEPIINYYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD

GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 E92D+S215P: A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 29)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKNKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLVGSAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNNGVSVLT SKVLDLKNYIDKQLLP IVNKQSCSI  
 PNIETVIEFQOKNNRLL EITREFSVNAGVTT PVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDI FNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL LSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**F24-E92D+S215P: RSV B1, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 30)**

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNI TEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KETKCNNGTDTKV KLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLGFLLVGSAIAS  
 GIAVSKVLHLEGEVNIKINALLSTNKAVVSLNNGVSVLT SKVLDLKNYINNQLLP IVNQQSCRI  
 PNIETVIEFQOKNSRLL EINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKEEV LAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDI FNSKYDCKIMTSKTDI SSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKLEGKNLYVK  
 GEPIINYYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDEL LSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+S215P+K508E: A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 31)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKIKCNNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTE LQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLVGSAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNNGVSVLT SKVLDLKNYIDKQLLP IVNKQSCSI  
 PNIETVIEFQOKNNRLL EITREFSVNAGVTT PVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDI FNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRESDEL LSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+S215P+E487I: A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 32)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVGS  
 IASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLT  
 SKVLDLKNYIDKQLLP  
 IVNKQSCSI  
 PNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTT  
 PVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQK  
 KLM  
 SNNVQIVRQOSYSIMSIIKEEV  
 LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGS  
 NICLTRTRD  
 RGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFC  
 DTMNSLTL  
 PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI  
 IKTF  
 SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV  
 NKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFP  
 SDIFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYI  
 PEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+S215P+E487Q: A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 33)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 LSNIKKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVGS  
 AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLT  
 SKVLDLKNYIDKQLLP  
 IVNKQSCSI  
 PNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTT  
 PVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQK  
 KLM  
 SNNVQIVRQOSYSIMSIIKEEV  
 LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGS  
 NICLTRTRD  
 RGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFC  
 DTMNSLTL  
 PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI  
 IKTF  
 SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV  
 NKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFP  
 SDQFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYI  
 PEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+S215P+E487N: A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 34)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVGS  
 IASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLT  
 SKVLDLKNYIDKQLLP  
 IVNKQSCSI  
 PNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTT  
 PVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQK  
 KLM  
 SNNVQIVRQOSYSIMSIIKEEV  
 LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGS  
 NICLTRTRD  
 RGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFC  
 DTMNSLTL  
 PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI  
 IKTF  
 SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV  
 NKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFP  
 SDNFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYI  
 PEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+S215P+D486N: A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 35)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVGS  
 IASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLT  
 SKVLDLKNYIDKQLLP  
 IVNKQSCSI

PNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+S215P+K465E: A2, стабилизированный линкером,  
 фибритин (SEQ ID NO: 36)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVGSIAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNNGVSVLTISKVLDLKNYIDKQLLPVFNKQSCSI  
PNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGESLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+S215P+K465Q: A2, стабилизированный линкером,  
 фибритин (SEQ ID NO: 37)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVGSIAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNNGVSVLTISKVLDLKNYIDKQLLPVFNKQSCSI  
PNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGQSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+S215P+N426S: A2, стабилизированный линкером,  
 фибритин (SEQ ID NO: 38)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVGSIAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNNGVSVLTISKVLDLKNYIDKQLLPVFNKQSCSI  
PNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV

ITSLGAIVSCYGKTKCTASSKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+S215P+K421N: A2, стабилизированный линкером,  
 фибритин (SEQ ID NO: 39)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLVGSAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSI  
 PNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNV  
 QIVRQOQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTNCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+S215P+K209Q: A2, стабилизированный линкером,  
 фибритин (SEQ ID NO: 40)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLVGSAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVQOQSCSI  
 PNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNV  
 QIVRQOQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+S215P+K201Q: A2, стабилизированный линкером,  
 фибритин (SEQ ID NO: 41)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLVGSAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDQQLLPVNVKQSCSI  
 PNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNV  
 QIVRQOQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+S215P+V185N: A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 42)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVGSIAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSN<sup>NS</sup>SVLTSKVLDLKNYIDKQLLP<sup>I</sup>VNKQSCSI  
<sup>P</sup>NIETVIEFQ<sup>Q</sup>KNNR<sup>L</sup>LEITREFSVNAGV<sup>T</sup>TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNV  
 QIVRQ<sup>Q</sup>SY<sup>S</sup>IMSIIKEEV<sup>L</sup>AYV<sup>V</sup>QLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICL<sup>R</sup>TRTD<sup>R</sup>GWY  
 CDNAGSVSFFPQ<sup>A</sup>ETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAI<sup>V</sup>SCY<sup>G</sup>KTCTASNKNRGI<sup>I</sup>KTF<sup>S</sup>NGCDYVSNKGVD<sup>T</sup>VS<sup>V</sup>GN<sup>T</sup>LYV<sup>N</sup>KQEGKSLYVK  
 GEPIIN<sup>F</sup>YDPLV<sup>F</sup>PSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL<sup>L</sup>SAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+S215P+G184N: A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 43)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVGSIAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSN<sup>NS</sup>SVLTSKVLDLKNYIDKQLLP<sup>I</sup>VNKQSCSI  
<sup>P</sup>NIETVIEFQ<sup>Q</sup>KNNR<sup>L</sup>LEITREFSVNAGV<sup>T</sup>TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNV  
 QIVRQ<sup>Q</sup>SY<sup>S</sup>IMSIIKEEV<sup>L</sup>AYV<sup>V</sup>QLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICL<sup>R</sup>TRTD<sup>R</sup>GWY  
 CDNAGSVSFFPQ<sup>A</sup>ETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAI<sup>V</sup>SCY<sup>G</sup>KTCTASNKNRGI<sup>I</sup>KTF<sup>S</sup>NGCDYVSNKGVD<sup>T</sup>VS<sup>V</sup>GN<sup>T</sup>LYV<sup>N</sup>KQEGKSLYVK  
 GEPIIN<sup>F</sup>YDPLV<sup>F</sup>PSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL<sup>L</sup>SAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+S215P+N175P: A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 44)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVGSIAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKSALLST<sup>P</sup>KAVVSLSN<sup>NS</sup>SVLTSKVLDLKNYIDKQLLP<sup>I</sup>VNKQSCSI  
<sup>P</sup>NIETVIEFQ<sup>Q</sup>KNNR<sup>L</sup>LEITREFSVNAGV<sup>T</sup>TPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNV  
 QIVRQ<sup>Q</sup>SY<sup>S</sup>IMSIIKEEV<sup>L</sup>AYV<sup>V</sup>QLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICL<sup>R</sup>TRTD<sup>R</sup>GWY  
 CDNAGSVSFFPQ<sup>A</sup>ETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAI<sup>V</sup>SCY<sup>G</sup>KTCTASNKNRGI<sup>I</sup>KTF<sup>S</sup>NGCDYVSNKGVD<sup>T</sup>VS<sup>V</sup>GN<sup>T</sup>LYV<sup>N</sup>KQEGKSLYVK  
 GEPIIN<sup>F</sup>YDPLV<sup>F</sup>PSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL<sup>L</sup>SAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+S215P+E92D: A2, стабилизированный линкером, фибритин (SEQ ID NO: 45)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI

KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVGSIAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTISKVLDLKNYIDKQLLPVINKQSCSI  
 PNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPSTYMLTNSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNV  
 QIVRQOQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+S215P+K80E: A2, стабилизированный линкером,  
 фибритин (SEQ ID NO: 46)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKIKCNGTDAKIKLIEQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVGSIAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTISKVLDLKNYIDKQLLPVINKQSCSI  
 PNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPSTYMLTNSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNV  
 QIVRQOQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+S215P+K77E: A2, стабилизированный линкером,  
 фибритин (SEQ ID NO: 47)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKIKCNGTDAKIELIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVGSIAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTISKVLDLKNYIDKQLLPVINKQSCSI  
 PNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPSTYMLTNSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNV  
 QIVRQOQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24 N67I+S215P+S46G: A2, стабилизированный линкером,  
 фибритин (SEQ ID NO: 48)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVGSIAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTISKVLDLKNYIDKQLLPVINKQSCSI  
 PNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPSTYMLTNSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNV

QIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24: RSV S46G A2, стабилизированный линкером, фибритин  
 (SEQ ID NO: 49)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKNKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLVGSAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLT SKVLDLKNYIDKQLLPVFNKQSCSI  
 SNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24: RSV K465Q A2, стабилизированный линкером, фибритин  
 (SEQ ID NO: 50)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKNKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLVGSAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLT SKVLDLKNYIDKQLLPVFNKQSCSI  
 SNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGQSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEWVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24: RSV N67I A2, стабилизированный линкером, фибритин  
 (SEQ ID NO: 51)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKI\_KCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLVGSAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLT SKVLDLKNYIDKQLLPVFNKQSCSI  
 SNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVK

GEP IINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEVLLSTFLGGIEGR

**A2\_F24: RSV E92D A2, стабилизированный линкером, фибритин  
 (SEQ ID NO: 52)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKNKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVSIAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIIDKQLLP IVNKQSCSI  
 SNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVK  
 GEP IINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAPRDGQAYVRKD  
 GEVLLSTFLGGIEGR

**Полноразмерная последовательность белка F RSV CL57-v224 (SEQ  
 ID NO: 69)**

MELPILKTNAITTTILAAVTLCFASSQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTE LQLLMQSTPAANNRARRRELPRFMNYTLNNTKNNNV  
 LSKKRKRFLGFLGVSIAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKV  
 LDLKNIIDKQLLP IVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSE  
 LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP  
 LCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNI  
 DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVD  
 TVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEP IINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL  
 LHNVNVGKSTTNIMITTTIIIVI I VILLLLIAVGLFLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNIAFSN

**Эктодомен, RSV CL57-v224 (SEQ ID NO: 70)**

MELPILKTNAITTTILAAVTLCFASSQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTE LQLLMQSTPAANNRARRRELPRFMNYTLNNTKNNNV  
 LSKKRKRFLGFLGVSIAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKV  
 LDLKNIIDKQLLP IVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSE  
 LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP  
 LCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTL PSEVNLCNI  
 DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVD  
 TVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEP IINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL  
 L

**PreF, RSV A2, фибритин (SEQ ID NO: 71)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI

KKNKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELOQLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTV  
 LSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKV  
 LDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSE  
 LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP  
 LCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNV  
 DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVD  
 TVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSEDEL  
 LSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

**PreF N67I S215P, RSV A2, фибритин (SEQ ID NO: 72)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELOQLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTV  
 LSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKV  
 LDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSE  
 LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP  
 LCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNV  
 DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVD  
 TVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSEDEL  
 LSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

**PreF N67I S215P, RSV B1, фибритин (SEQ ID NO: 73)**

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KEIKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELOQLMQNTPAANNRARREAPQYMNITINTTKNLNVS  
 ISKKRKRKRRFLGFLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKNALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKV  
 LDLKNYINNQLLPVNVQQSCRIPNIETVIEFQQKNSRLLLEINREFSVNAGVTPPLSTYMLTNSE  
 LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSP  
 LCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVSLCNT  
 DIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVD  
 TVSVGNTLYYVNVKLEGKNLYVKGEPIINYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDEL  
 LSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

**RSV N67I S215P, RSV CL57-v224, фибритин (SEQ ID NO: 74)**

MELPILKTNAITTILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KEIKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELOQLMQSTPAANNRARRELPRFMNYTLNNTKNNNV  
 LSKKRKRRFLGFLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKV  
 LDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSE  
 LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP  
 LCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNI  
 DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVD

TVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL  
LSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

**PreFL N67I S215P, RSV B1, фибритин, петля (SEQ ID NO: 22)**

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIELSNI  
KEIKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSLGFLLGVSIAIAS  
GIAVSKVLHLEGEVNIKNALLSTNKAVVSLNMGVSVLTSKVLDLKNYINNQLLPVNVQOSCR  
PNIETVIEFQQKNSRLLEINREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNV  
QIVRQOSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTRDRGWY  
CDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSV  
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKLEGKNLYVK  
GEPIINYYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDEL LSAIGGYIPEAPRDGQAYVRK  
GEWVLLSTFL

**PreFL N67I S215P, RSV CL57-v224, фибритин, петля (SEQ ID NO:  
75)**

MELPILKTNAITTILAAVTLFCFASQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
KEIKCNGTDAKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPAANNQARGSGSGRSLGFLLGVSIAIAS  
GIAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNMGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSI  
PNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNV  
QIVRQOSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNL CNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSV  
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVK  
GEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL LSAIGGYIPEAPRDGQAYVRK  
GEWVLLSTFL

**PreF N67I S215P E487Q, RSV A2, фибритин (SEQ ID NO: 76)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTV  
LSKRRRFLGFLLGVSIAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNMGVSVLTSKV  
LDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPSTYMLTNSE  
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQOSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP  
LCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNL CNV  
DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGV  
TVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPDQFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL  
LSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

**PreF N67I S215P K201N, RSV A2, фибритин (SEQ ID NO: 77)**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTV

LSKRRRFLGFLGVSASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKV  
 LDLKNYIDNQLLPVNVKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSE  
 LLSLINDMPITNDQKLMSSNVQIVRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP  
 LCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNV  
 DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVD  
 TVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL  
 LSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

**PreF N67I S215P E92D, RSV A2, фибритин (SEQ ID NO:78)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTV  
 LSKRRRFLGFLGVSASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKV  
 LDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSE  
 LLSLINDMPITNDQKLMSSNVQIVRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP  
 LCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNV  
 DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVD  
 TVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL  
 LSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

**PreF N67I S215P D486N, RSV A2, фибритин (SEQ ID NO: 79)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELOQLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTV  
 LSKRRRFLGFLGVSASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKV  
 LDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSE  
 LLSLINDMPITNDQKLMSSNVQIVRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP  
 LCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNV  
 DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVD  
 TVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL  
 LSAIGGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL

**Fwt N67I S215P, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID NO:  
 80)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELOQLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTV  
 LSKRRRFLGFLGVSASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKV  
 LDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSE  
 LLSLINDMPITNDQKLMSSNVQIVRQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP  
 LCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNV  
 DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVD

TVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL  
LHNVNAVKSTTNIMITTIIIVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

**Fs1 N67I S215P, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID NO: 81)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVGSAIAS  
GVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQSCSI  
PNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNV  
QIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVK  
GEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAVKSTTNIMITTIIIVI  
IVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

**Fwt N67I S215P E92D, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID NO: 82)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVT  
LSKKRKRFLGFLLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKV  
LDLKNYIDKQLLPVVKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSE  
LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP  
LCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNV  
DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSNKGVD  
TVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL  
LHNVNAVKSTTNIMITTIIIVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

**Fs1 N67I S215P E92D, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID NO: 83)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
KKIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTDLQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLLGVGSAIAS  
GVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQSCSI  
PNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNV  
QIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVK  
GEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAVKSTTNIMITTIIIVI  
IVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

**Fwt N67I S215P E487Q, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID**

**NO: 84)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKI KCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVT  
 LSKRKR RFLGFL LGVGS AIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLN GVS VLT SKV  
 LDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSIPNIETVIEFQQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSE  
 LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQOSYSIMSIIKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP  
 LCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNV  
 DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVD  
 TVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPDQFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL  
 LHNVNAVKSTTNIMITTII IIVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

**Fs1 N67I S215P E487Q, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID NO: 85)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKI KCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFL LGVGS AIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLN GVS VLT SKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSIP  
 NIETVIEFQQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNV  
 QIVRQOSYSIMSIIKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNV DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVK  
 GEPI INFYDPLVFPDQFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAVKSTTNIMITTII IIVI  
 IVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

**Fwt N67I S215P D486N, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID NO: 86)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKI KCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVT  
 LSKRKR RFLGFL LGVGS AIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLN GVS VLT SKV  
 LDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSIPNIETVIEFQQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSE  
 LLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQOSYSIMSIIKEEV LAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP  
 LCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNV  
 DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVD  
 TVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPDQFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL  
 LHNVNAVKSTTNIMITTII IIVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

**Fs1 N67I S215P D486N, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID NO: 87)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNI  
 KKI KCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFL LGVGS AIAS

GVAVSKVLHLEGEVNIKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPVNVKQSCSI  
 PNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAVKSTTNIMITTIIIVI  
 IVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

**Fwt N67I S215P S46G, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID NO: 88)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSVITIELSNI  
 KIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTVT  
 LSKRKRRLFLGFLGVSIAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKV  
 LDLKNIYIDKQLLPVNVKQSCSI PNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNSE  
 LLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSP  
 LCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNV  
 DIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDT  
 TVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEL  
 LHVNAVKSTTNIMITTIIIVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

**Fs1 N67I S215P S46G, мембранно-связанный F RSV, A2 (SEQ ID NO: 89)**

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSVITIELSNI  
 KIKCNGTDAKIKLIKQELDKYKNAVTELOLLMQSTPATNNQARGSGSGRSLGFLGVSIAIAS  
 GVAVSKVLHLEGEVNIKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPVNVKQSCSI  
 PNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTVPVSTYMLTNSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNV  
 QIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWY  
 CDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV  
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVK  
 GEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAVKSTTNIMITTIIIVI  
 IVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

**CR9501, тяжелая цепь (SEQ ID NO: 53):**

QVQLVQSGPGLVKPSQTLALTCNVSGASINSDNYWYTWIRQRPGGGLEWIGHISYTGNTYYTPS  
 LKSRLSMSLETSQSQFSLRLTSVTAADSAVYFCAACGAYVLI SNCGWFDSWGQGTQVTVSSAST  
 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLS  
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

**CR9501, легкая цепь (SEQ ID NO: 61):**

EIVMTQSPSSLSASIGDRVITITCQASQDISTYLNWYQQKPGQAPRLLIYGASNLETGVPSRFTG

SGYGTDFSVTISSLQPEDIATYYCQQYQYLPYTFAPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG  
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY  
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**CR9502, тяжелая цепь (SEQ ID NO: 57):**

EVQLLQSGAELKKPGASVKISCKTSGFTFSGHTIAWVRQAPGQGLEWMGWVSTNNGNTEYAQKI  
QGRVTMTMDTSTSTVYMELRSLTSDDTAVYFCAREWLVMGGFADHWGQGTLLTVSSASTKGPS  
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV  
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC

**CR9502, легкая цепь (SEQ ID NO: 65):**

QSVLTQASSVSVAPGQTARITCGANNIGSQNVHWYQQKPGQAPVLLVYDDRDRPSGIPDRFSGS  
NSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSRDQAVIFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEL  
QANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR  
SYSCQVTHEGSTVEKTIAPTECS

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Рекомбинантный полипептид слияния (F) респираторного синцитиального вируса (RSV) до слияния, содержащий:

- мутацию аминокислотного остатка N/T в положении 67 в I,
- мутацию аминокислотного остатка S в положении 215 в P,
- мутацию аминокислотного остатка D в положении 486 в N;

где положения аминокислот приведены со ссылкой на последовательность F-белка RSV из штамма A2 (SEQ ID NO: 1).

2. Рекомбинантный F-полипептид RSV до слияния по п. 1, где полипептид содержит гетерологичный домен тримеризации, связанный с указанным усеченным доменом F1, где гетерологичный домен тримеризации содержит аминокислотную последовательность GYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFL (SEQ ID NO: 4).

3. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую F-полипептид RSV до слияния по п. 1, где вектор представляет собой аденовирусный вектор.

4. Вектор по п. 3, где аденовирусный вектор представляет собой Ad26.

5. Композиция, содержащая рекомбинантный F-полипептид RSV до слияния по п. 1 или 2 и вектор по п. 3 или 4.

6. Композиция по п. 5 для применения в качестве медикамента.

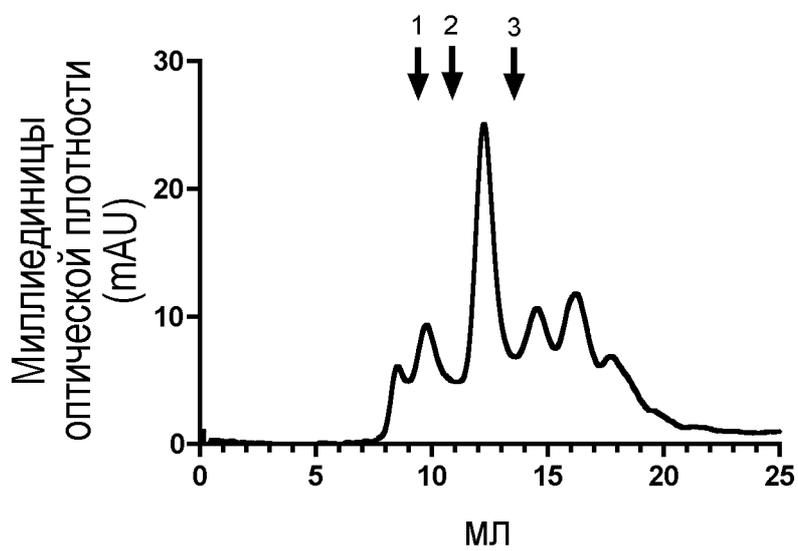
7. Применение рекомбинантного F-полипептида RSV до слияния по любому из пп. 1 или 2 и вектора по п. 3 или 4 для индуцирования иммунного ответа к F-белку RSV.

8. Применение рекомбинантного F-полипептида RSV до слияния по любому из пп. 1 или 2 и вектора по п. 3 или 4 в качестве вакцины.

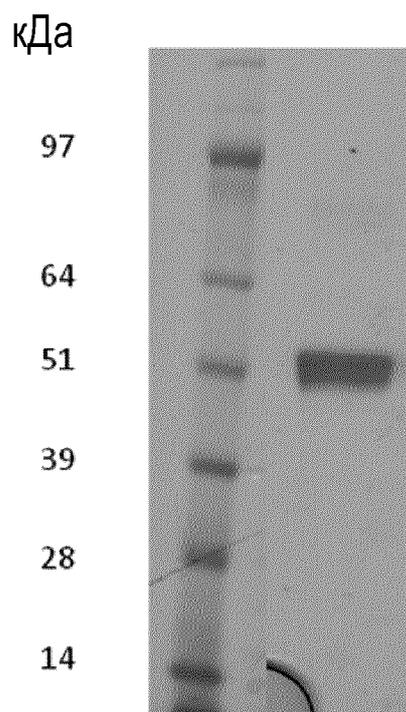
9. Применение рекомбинантного F-полипептида RSV до слияния по любому из пп. 1 или 2 и вектора по п. 3 или 4 для профилактики и/или лечения инфекции RSV.

По доверенности

A.

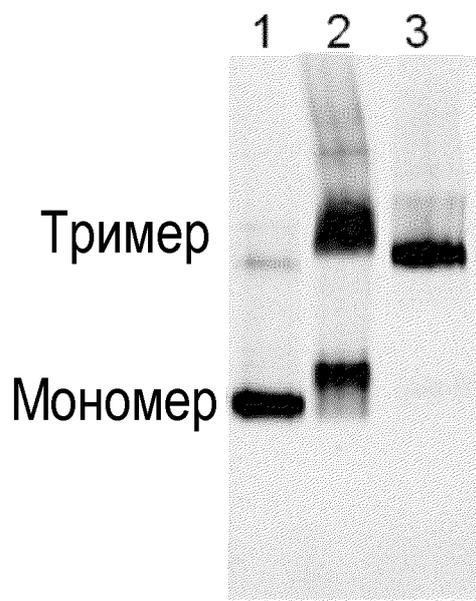


B.



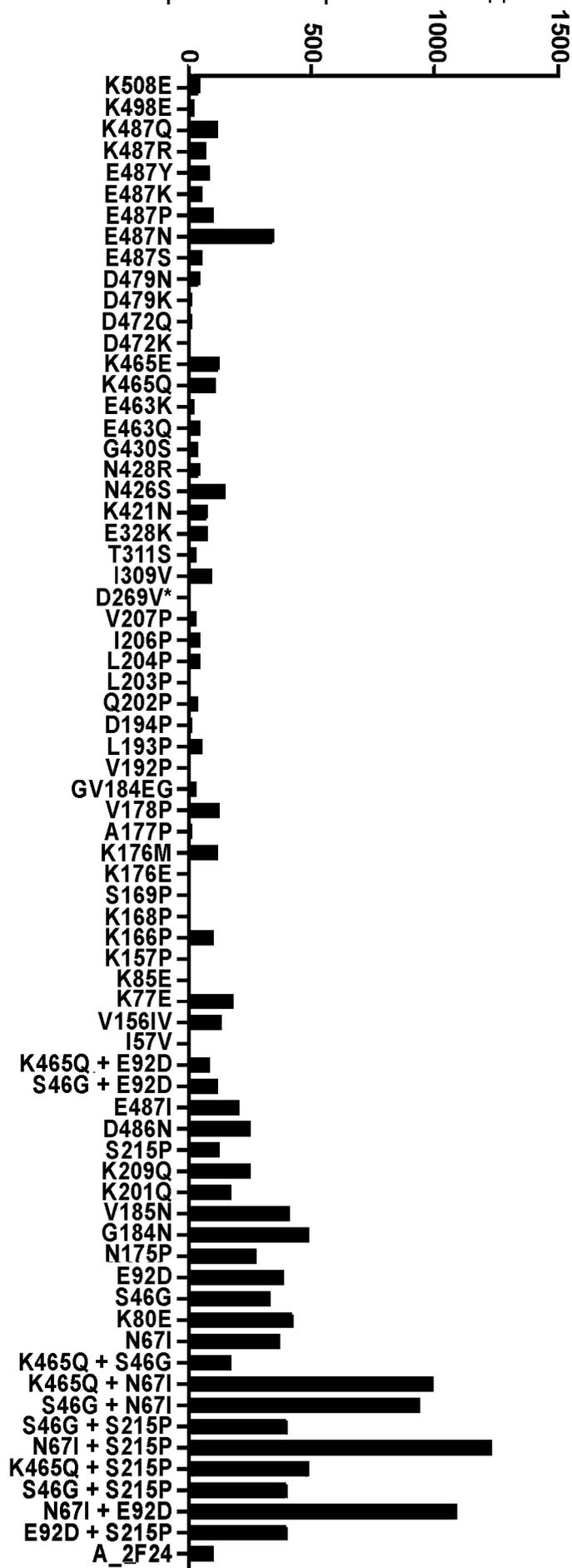
ФИГ.1

NativePAGE



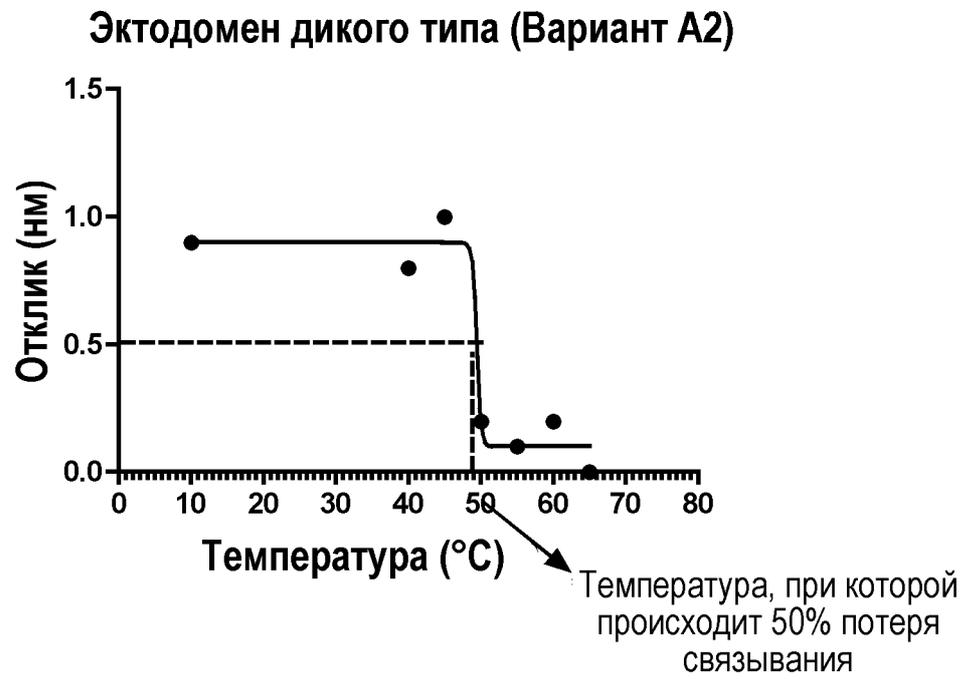
ФИГ.2

% экспрессии по сравнению с диким типом

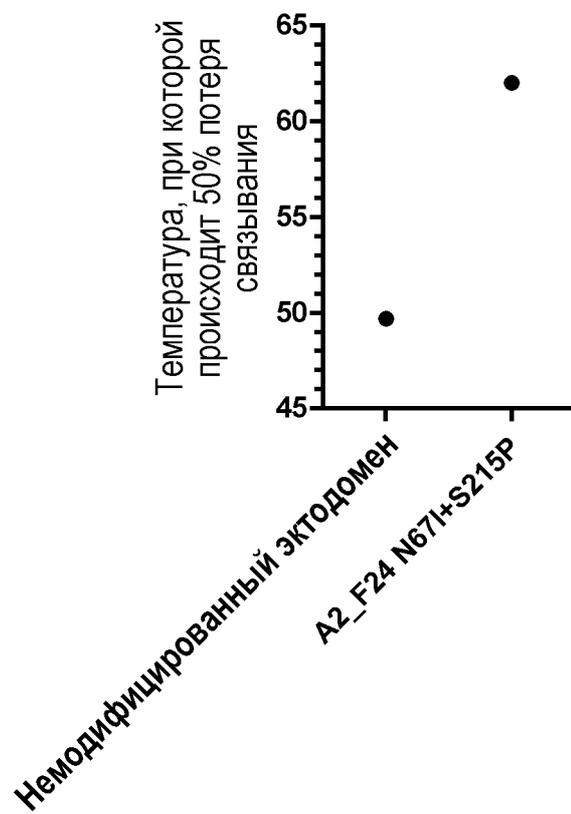


ФИГ.3

А.



В.

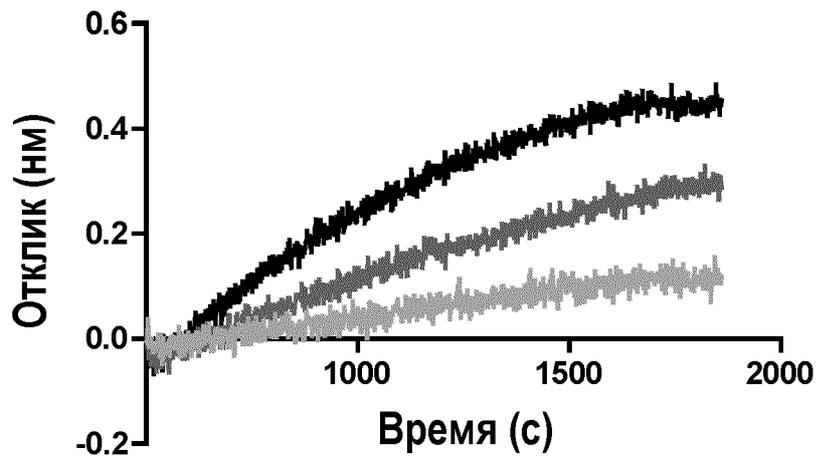


ФИГ.4

5/12

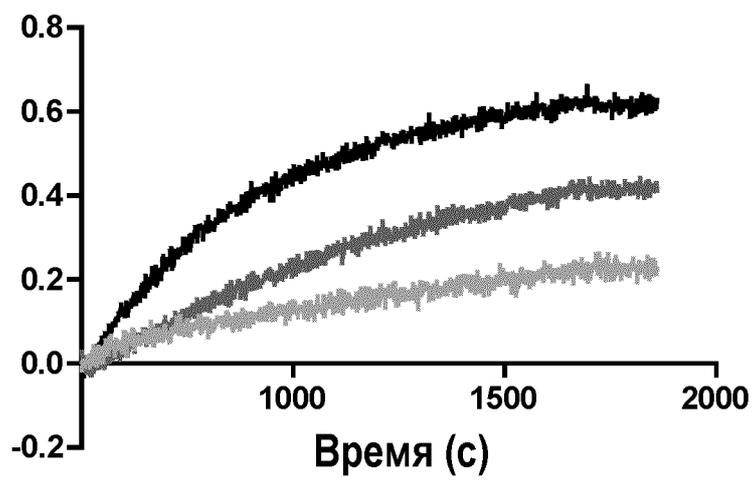
A.

A2\_F24



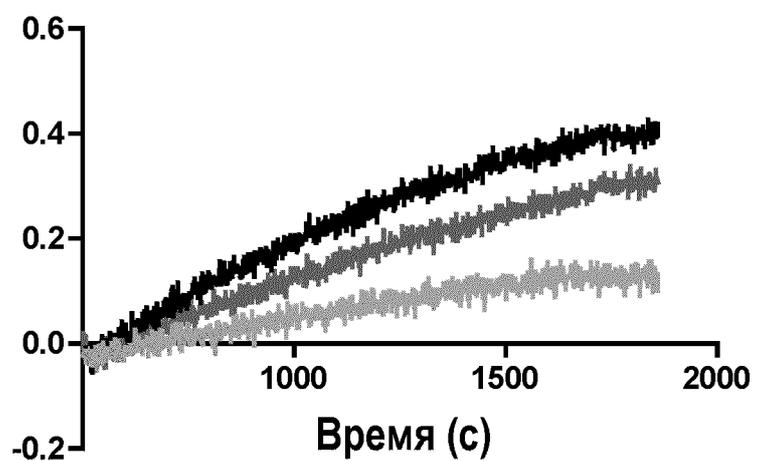
B.

K465Q



C.

S46G

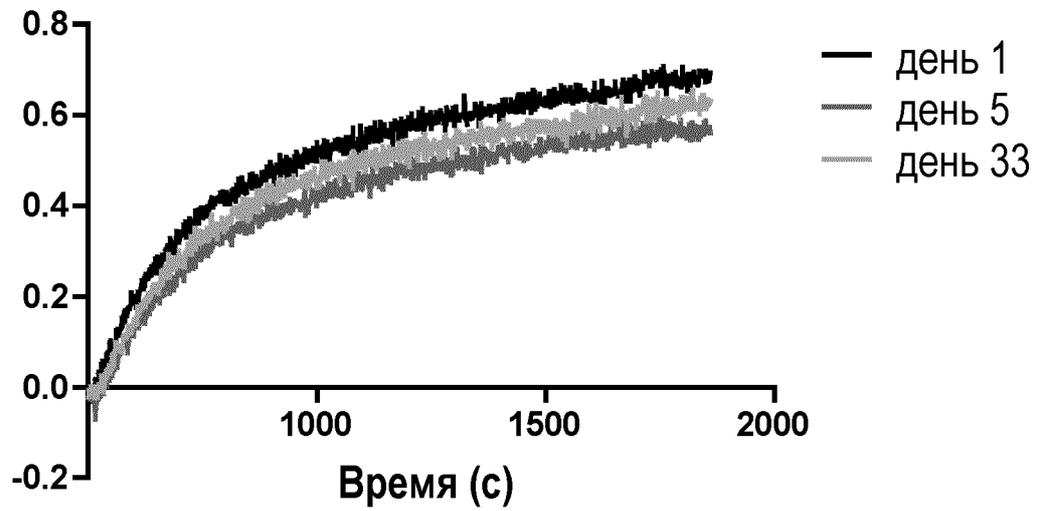


ФИГ.5

6/12

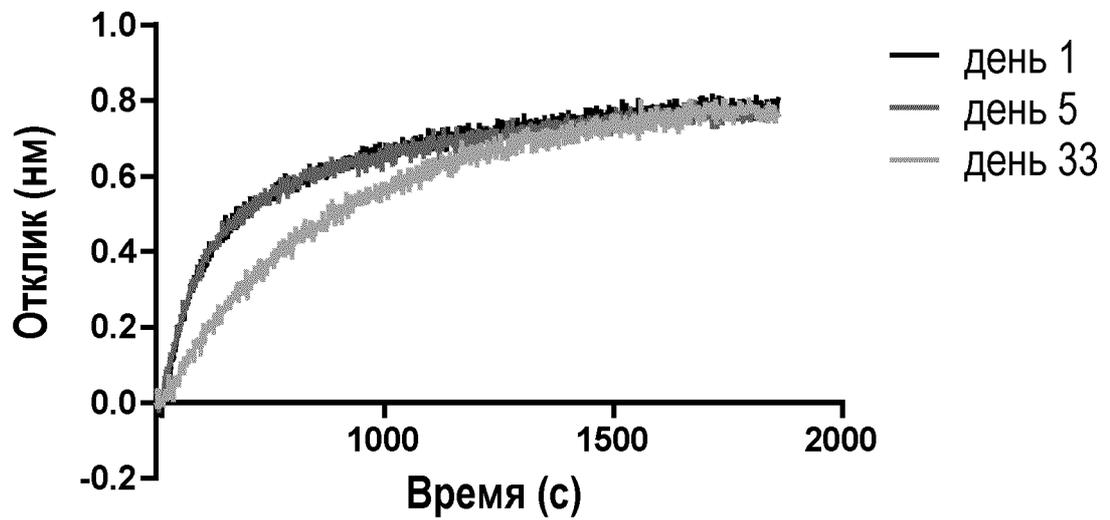
D.

N67I



E.

E92D

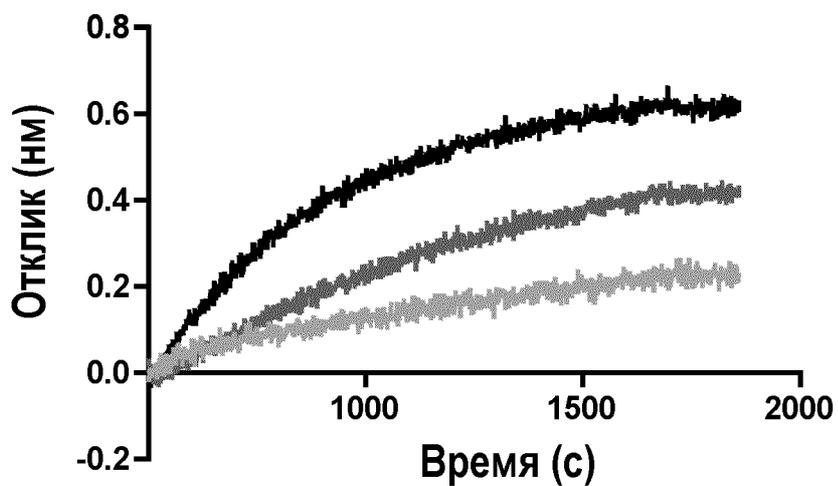


ФИГ.5, продолжение

7/12

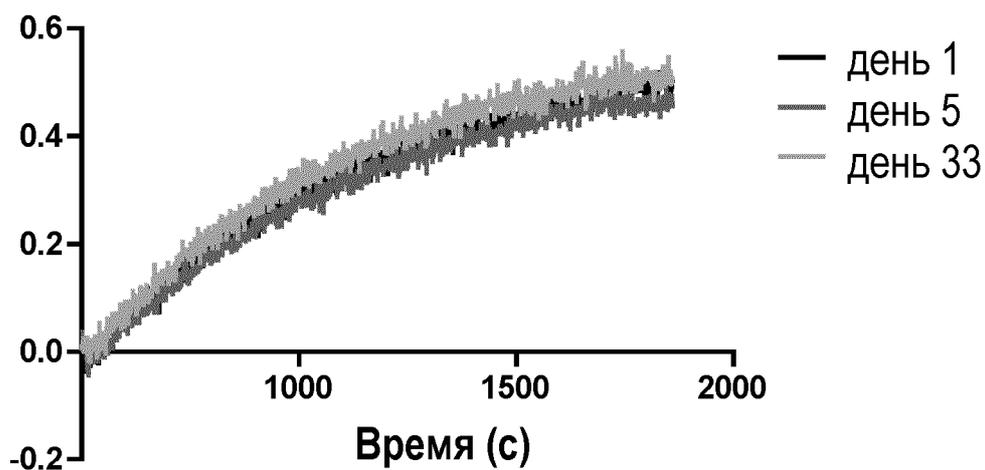
A.

K465Q



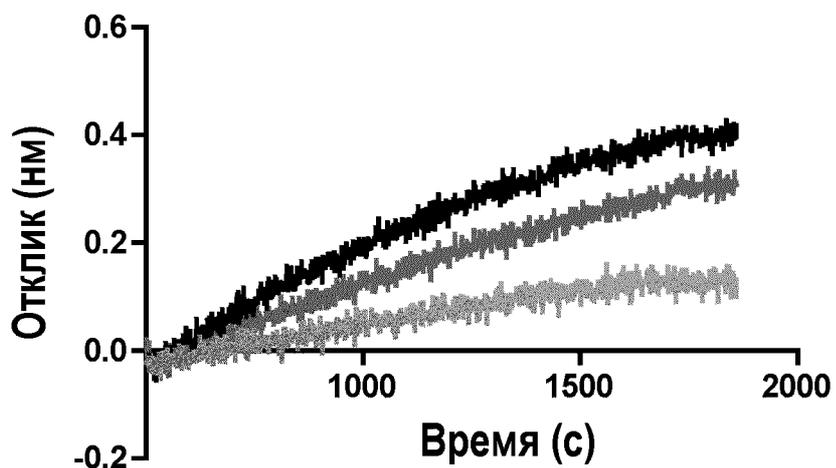
B.

K465Q, N67I



C.

S46G

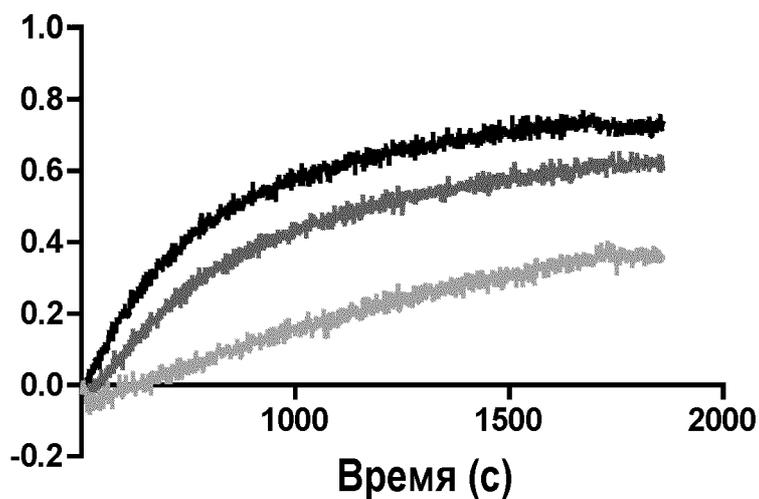


ФИГ.6

8/12

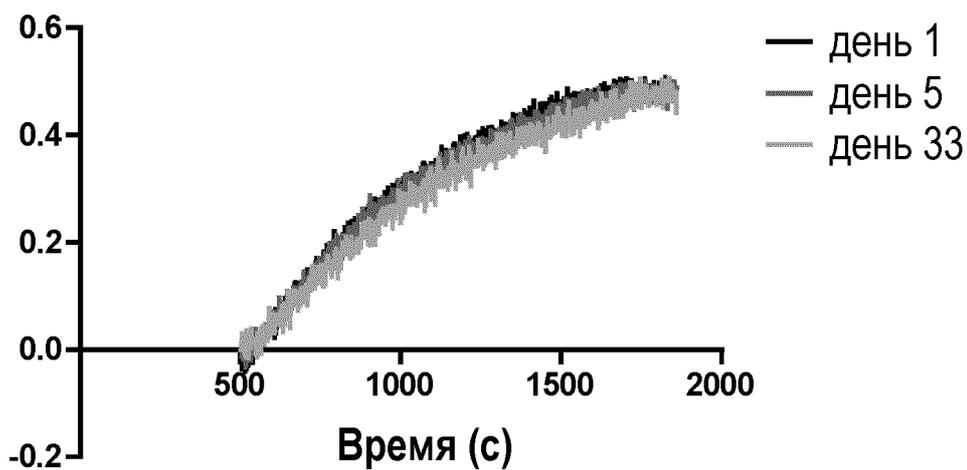
D.

S46G, E92D



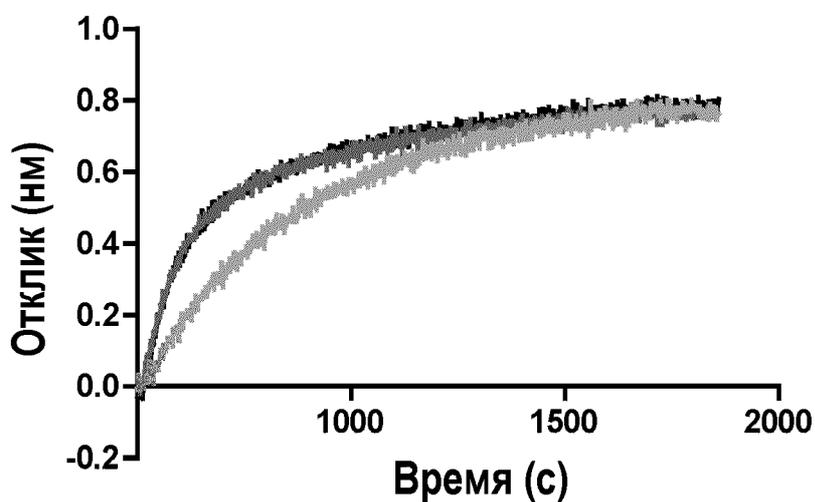
E.

S46G, N67I



F.

E92D

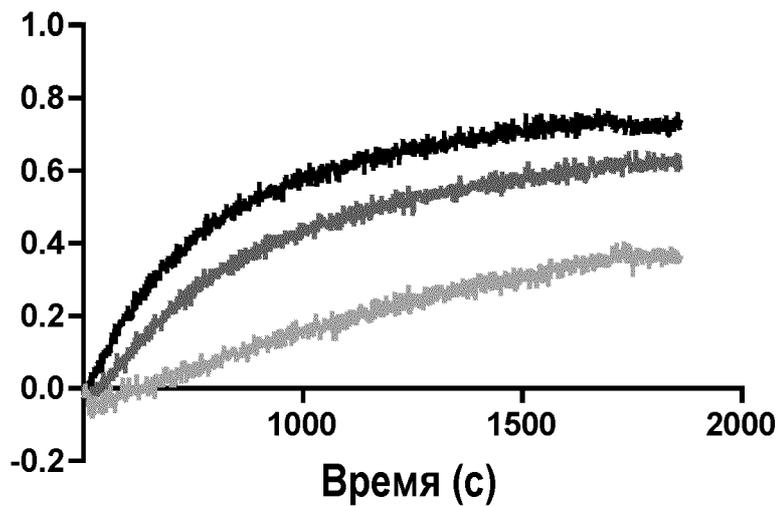


ФИГ.6, продолжение

9/12

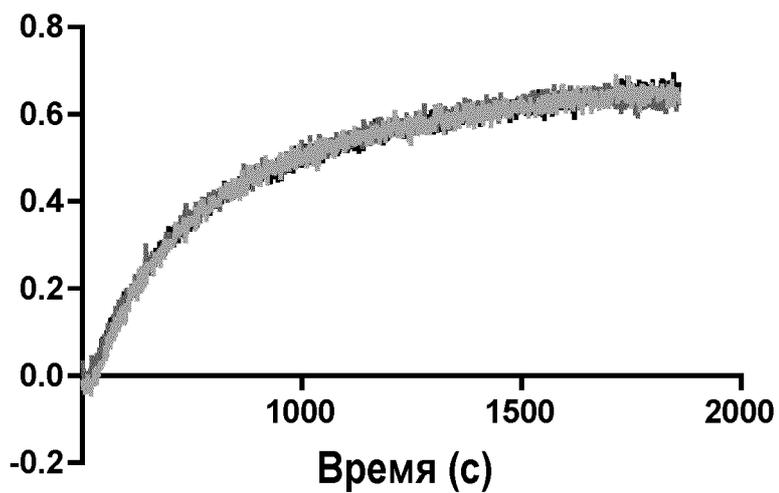
S46G, E92D

G.



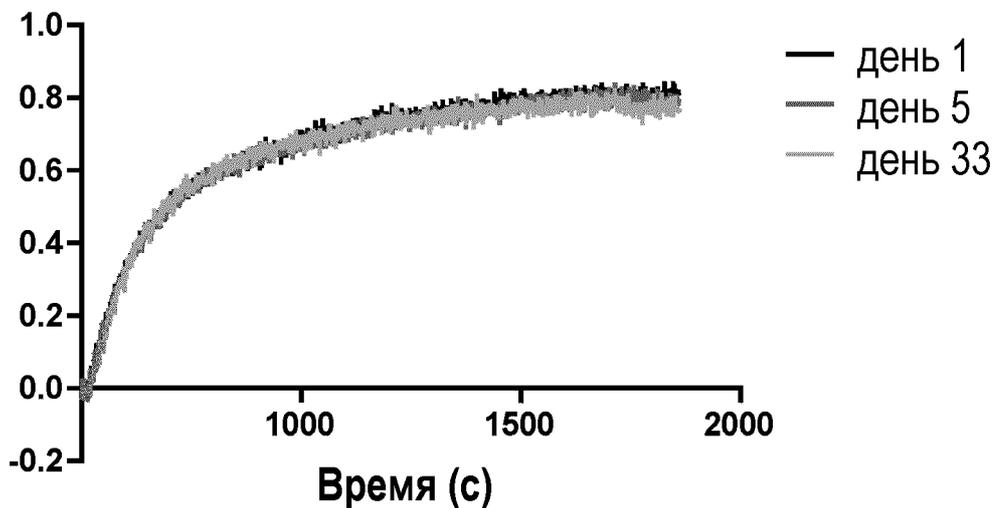
N67I, E92D

H.



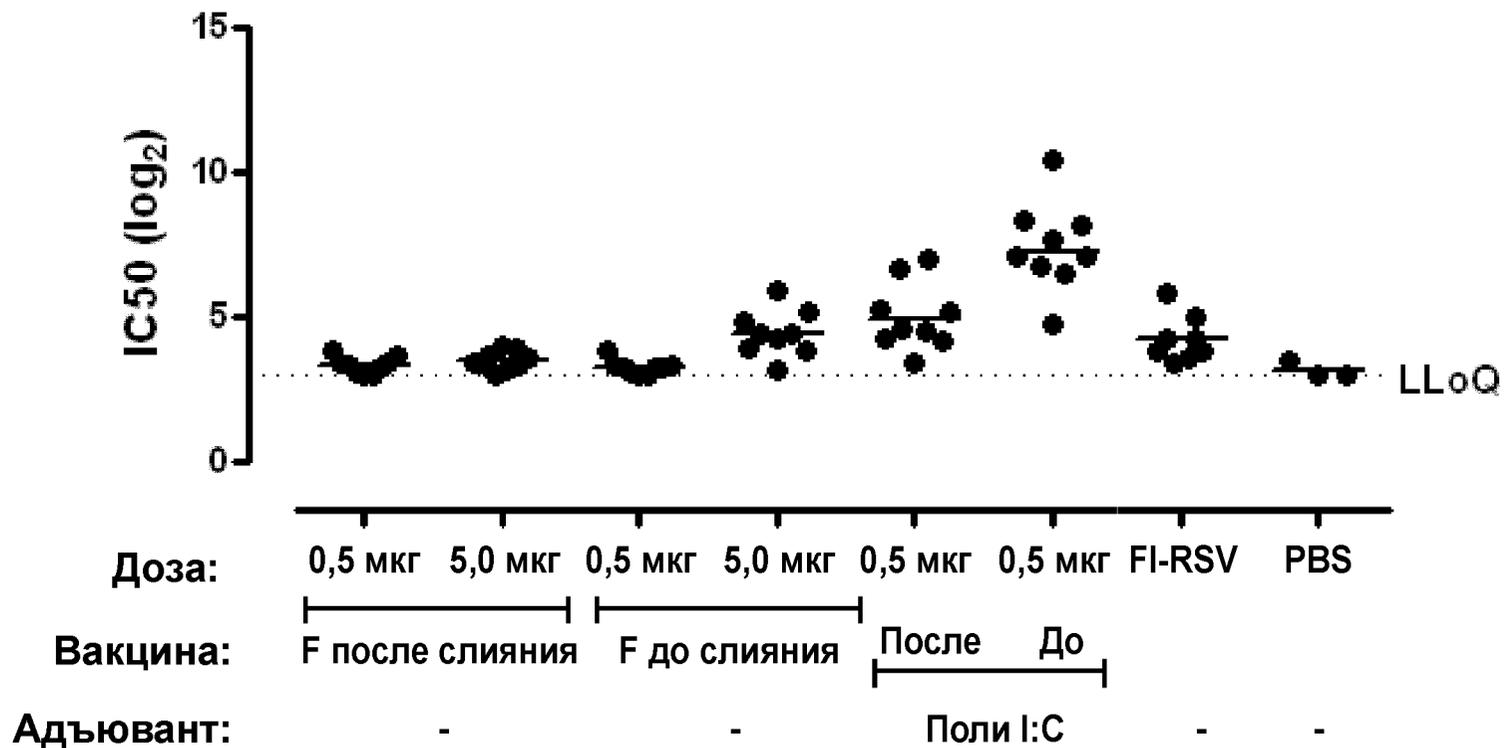
E92D, S215P

I.



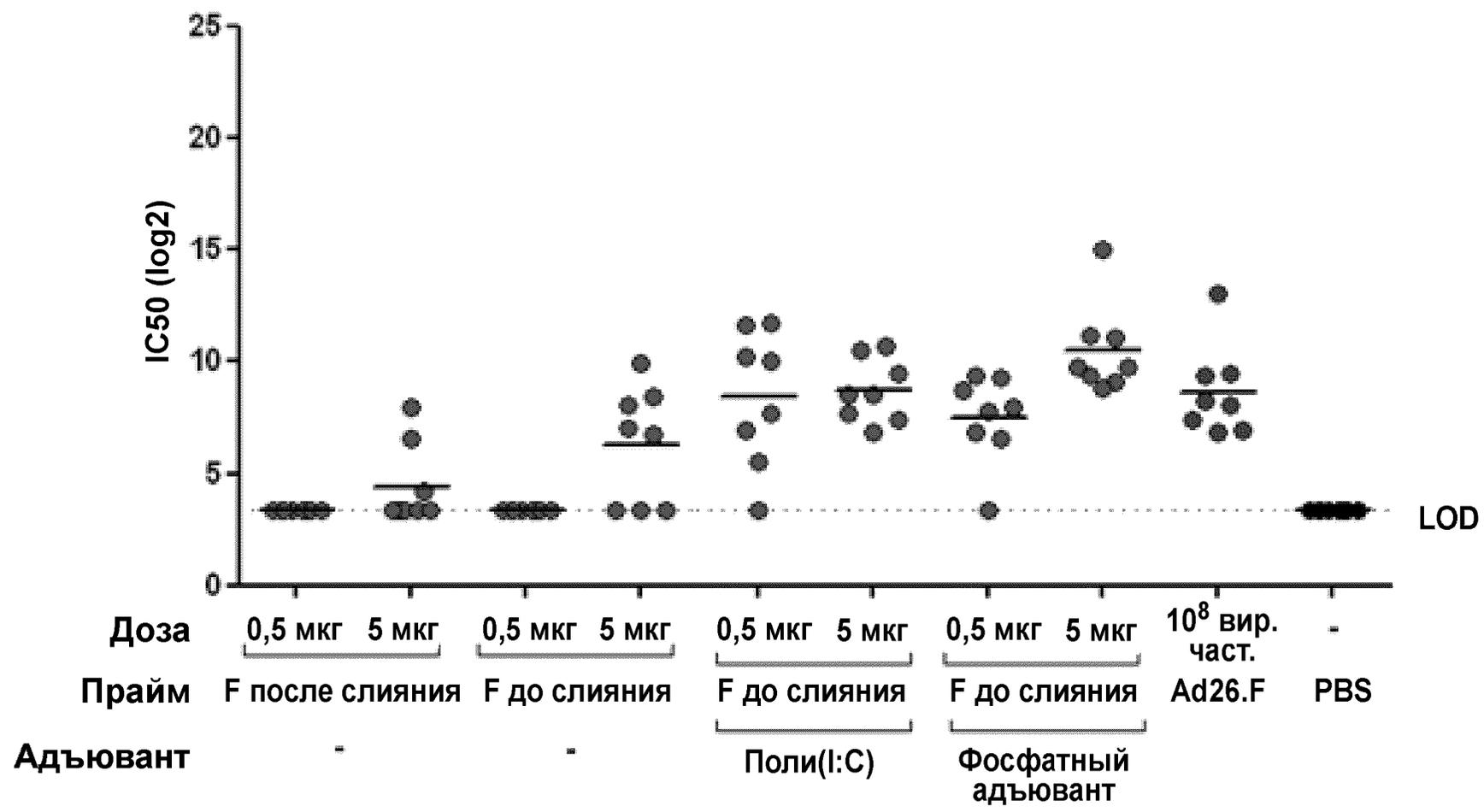
ФИГ.6, продолжение

IVWP 30700113  
*RSV Long, t = 6 недель*

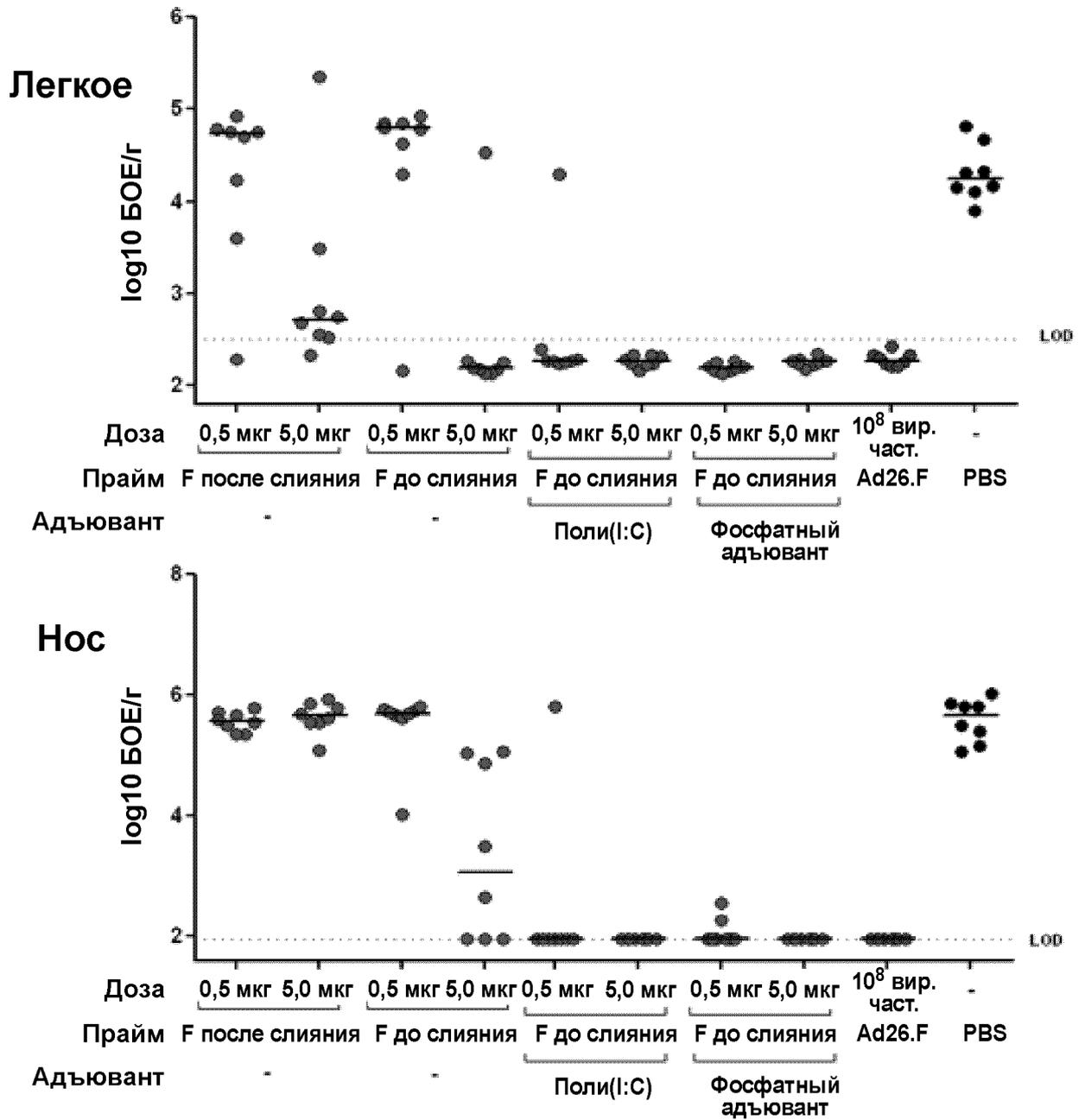


10/12

ФИГ.7



ФИГ.8



ФИГ.9

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 0214WO00ORD	<b>FOR FURTHER ACTION</b> see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2014/058353	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 24 April 2014 (24-04-2014)	(Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> ) 25 April 2013 (25-04-2013)
Applicant  CRUCCELL HOLLAND B.V.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed  
 a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b.  This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c.  With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2.  **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3.  **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant  
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant  
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. \_\_\_\_\_  
 as suggested by the applicant  
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure  
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b.  none of the figures is to be published with the abstract

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2014/058353

## Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
  - a. (means)
    - on paper
    - in electronic form
  - b. (time)
    - in the international application as filed
    - together with the international application in electronic form
    - subsequently to this Authority for the purpose of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2014/058353

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. A61K39/155 C07K14/135  
ADD.  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED  
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
A61K C07K C12N  
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
EPO-Internal, EMBL, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/006596 A2 (CALMUNE CORP) 12 January 2012 (2012-01-12) cited in the application example 12 figure 3	1,2,4, 19-22, 24-31
X	WO 2012/158613 A1 (NOVARTIS AG) 22 November 2012 (2012-11-22) cited in the application  paragraphs [0010], [0017] page 21, paragraph 62 page 22, paragraph 70  ----- -/--	1,2, 8-10, 15-17, 19,20, 24-32, 43-46

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  1 August 2014	Date of mailing of the international search report  12/08/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Mandl, Birgit

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2014/058353

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2011/050168 A2 (US OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY DEPT OF HEALTH AND HUMAN) 28 April 2011 (2011-04-28) page 32, last paragraph - page 33, paragraph 1 page 54, line 15 - page 55, line 32 example 5</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2,15, 16,19, 25-31
X	<p>WO 2011/008974 A2 (NOVARTIS AG) 20 January 2011 (2011-01-20)</p> <p>page 2, line 21 - page 3, line 3 page 20, line 17 - page 21, line 8 page 26, line 6 - page 32, line 18 examples 1-3</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2,10, 15-20, 24,25, 27-31
A	<p>M. MAGRO ET AL: "Neutralizing antibodies against the preactive form of respiratory syncytial virus fusion protein offer unique possibilities for clinical intervention", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 109, no. 8, 21 February 2012 (2012-02-21), pages 3089-3094, XP055067859, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1115941109 abstract page 3091, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1 figure 4</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-46
A	<p>YIN HSIEN-SHENG ET AL: "Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation", NATURE, vol. 439, no. 7072, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 38-44, XP002503490, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/NATURE04322 cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-46

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2014/058353

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P	J. S. MCLELLAN ET AL: "Structure of RSV Fusion Glycoprotein Trimer Bound to a Prefusion-Specific Neutralizing Antibody", SCIENCE, vol. 340, no. 6136, 25 April 2013 (2013-04-25), pages 1113-1117, XP055077617, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1234914 the whole document -----	1-46
A,P	J. S. MCLELLAN ET AL: "Structure-Based Design of a Fusion Glycoprotein Vaccine for Respiratory Syncytial Virus", SCIENCE, vol. 342, no. 6158, 31 October 2013 (2013-10-31), pages 592-598, XP055132637, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1243283 the whole document -----	1-46

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/058353

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012006596	A2	12-01-2012	AR 082149 A1 14-11-2012
			AU 2011274472 A1 29-11-2012
			CA 2805547 A1 12-01-2012
			CN 103097412 A 08-05-2013
			EA 201291243 A1 30-08-2013
			EP 2591000 A2 15-05-2013
			JP 2013539357 A 24-10-2013
			KR 20130111212 A 10-10-2013
			SG 186985 A1 28-02-2013
			TW 201201839 A 16-01-2012
			US 2013177573 A1 11-07-2013
			WO 2012006596 A2 12-01-2012
WO 2012158613	A1	22-11-2012	AU 2012255971 A1 02-05-2013
			CA 2835644 A1 22-11-2012
			CN 103842374 A 04-06-2014
			EP 2707385 A1 19-03-2014
			SG 194755 A1 30-12-2013
			WO 2012158613 A1 22-11-2012
WO 2011050168	A2	28-04-2011	US 2012315270 A1 13-12-2012
			WO 2011050168 A2 28-04-2011
WO 2011008974	A2	20-01-2011	AR 077757 A1 21-09-2011
			CA 2768186 A1 20-01-2011
			CN 102639147 A 15-08-2012
			CO 6491045 A2 31-07-2012
			EP 2453918 A2 23-05-2012
			JP 2012533558 A 27-12-2012
			RU 2012105308 A 20-08-2013
			SG 178026 A1 29-03-2012
			TW 201116294 A 16-05-2011
			US 2011305727 A1 15-12-2011
			US 2012164176 A1 28-06-2012
			WO 2011008974 A2 20-01-2011