

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043031**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.19

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

(21) Номер заявки
201892250

(22) Дата подачи заявки
2017.04.04

(54) ВАКЦИНА ПРОТИВ RSV(31) **16163807.7**(32) **2016.04.05**(33) **EP**(43) **2019.03.29**(86) **PCT/EP2017/057957**(87) **WO 2017/174564 2017.10.12**

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

(72) Изобретатель:
**Лангедейк Йоханнес Петрус Мария,
Верхаген Яннеке М. (NL)**

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

(56) WO-A1-2014202570
WO-A1-2013139911

KRARUP A. ET AL.: "A highly stable
prefusion RSV F vaccine derived from structural
analysis of the fusion mechanism", NATURE
COMMUNICATIONS, NATURE PUBLISHING
GROUP, UNITED KINGDOM, vol. 6, 3 September
2015 (2015-09-03), pages 8143-1, XP002755858,
ISSN: 2041-1723, DOI: 10.1038/NCOMMS9143
[retrieved on 2015-09-03] figures 2, 3, 7, 8

(57) Изобретение относится к новым молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим F-белок RSV до слияния или его иммунологически активную часть, где F-белок RSV до слияния содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или 2. Изобретение дополнительно относится к применению молекул нуклеиновой кислоты или векторов, содержащих указанные молекулы нуклеиновой кислоты, в качестве вакцины против респираторно-синцитиального вируса (RSV).

B1**043031****043031****B1**

Изобретение относится к области медицины. Более конкретно настоящее изобретение относится к вакцинам против RSV.

Предпосылки изобретения

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

RSV представляет собой парамиксовирус, принадлежащий к подсемейству *Pneumovirinae*. Его геном кодирует различные белки, в том числе мембранные белки, известные как гликопротеин (G) RSV и белок слияния (F) RSV, которые являются главными антигенными мишенями для нейтрализующих антител.

В отличие от G-белка F-белок RSV является консервативным среди штаммов RSV, что делает его перспективным кандидатом для вакцин, способным вызывать продуцирование широкого спектра нейтрализующих антител. F-белок представляет собой трансмембранный белок, и в ходе почкования вируса он встраивается в мембрану вириона из клеточной мембраны. F-белок RSV способствует инфицированию за счет слияния мембран вируса и клетки-хозяина. В процессе слияния F-белок подвергается необратимому рефолдингу из лабильной конформации до слияния в стабильную конформацию после слияния. Для белка-предшественника F0 требуется расщепление во время внутриклеточного созревания с помощью фуриноподобной протеазы. Существует два сайта для фуринов, расщепление которых в результате приводит к удалению пептида р27 и к образованию двух доменов: N-концевого домена F2 и С-концевого домена F1 (фиг. 1). Домены F2 и F1 связаны двумя цистеиновыми мостиками. Антитела к белку слияния могут предотвращать поглощение вируса клеткой и, таким образом, обладают нейтрализующим эффектом. Помимо того, что он является мишенью для нейтрализующих антител, F RSV содержит эпитопы для цитотоксических Т-клеток (Pemberton et al., 1987, J. Gen. Virol. 68: 2177-2182).

Несмотря на 50 лет исследований, все еще отсутствует разрешенная к применению вакцина против RSV. Одним из главных препятствий к разработке вакцины является опыт усиленного вакциной заболевания в клинических испытаниях в 1960 гг. при использовании инактивированной формалином (FI) вакцины против RSV. Дети, вакцинированные FI-RSV, не были защищены от естественной инфекции, и у инфицированных детей проявлялась более тяжелая болезнь, чем у невакцинированных детей, в том числе два летальных исхода. Это явление называется "усиленное заболевание".

Со времен испытания FI-RSV-вакцины были осуществлены различные подходы для создания RSV-вакцины. Попытки включали классические живые аттенуированные холодом пересеваемые или чувствительные к температуре мутантные штаммы RSV, вакцины на основе субъединиц (химерных) белков, пептидные вакцины и белки RSV, экспрессируемые с помощью рекомбинантных вирусных векторов, в том числе аденовирусных векторов. Хотя некоторые из данных вакцин показали перспективные данные доклинических исследований, ни одна из вакцин не была разрешена к применению у людей из-за проблем с безопасностью или отсутствия эффективности.

Следовательно, сохраняется потребность в эффективных вакцинах и способах вакцинации против RSV, в частности, вакцинах, которые не приводят к усиленному заболеванию. Целью настоящего изобретения являются получение таких вакцин и способы вакцинации против RSV безопасным и эффективным способом.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении представлены новые молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие стабильные F-белки RSV до слияния, где F-белки RSV до слияния содержат аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или 2.

В определенных вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие F-белки RSV до слияния, являются кодон-оптимизированными с целью экспрессии в клетках человека.

В определенных вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие F-белки RSV до слияния, содержат последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 3 или 4.

В настоящем изобретении дополнительно представлены векторы, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие F-белки RSV до слияния, где F-белок RSV содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или 2.

В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный аденовирус человека.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус представляет собой аденовирус серотипов 26 или 35.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус человека имеет делецию в участке E1, делецию в участке E3 или делецию в обоих участках E1 и E3 аденовирусного генома.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус имеет геном, содержащий в своих 5'-концевых участках последовательность СТАТСТАТ.

В настоящем изобретении также представлены композиции, например, вакцины против респираторно-синцитиального вируса (RSV), содержащие молекулы нуклеиновой кислоты или вектор по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении дополнительно предусматривается способ вакцинации субъекта против RSV, при этом способ включает введение субъекту композиции в соответствии с настоящим изобретением.

В определенных вариантах осуществления способ вакцинации субъекта против RSV дополнительно предусматривает введение F-белка RSV (предпочтительно составленного в виде фармацевтической композиции, таким образом, белковой вакцины) субъекту.

В настоящем изобретении также представлен способ уменьшения тяжести инфекции и/или репликации RSV, например, в носоглотке и легких субъекта, предусматривающий введение субъекту композиции, содержащей нуклеиновую кислоту или вектор в соответствии с настоящим изобретением. Это будет снижать неблагоприятные эффекты, возникающие у субъекта в результате инфекции, вызванной RSV, и таким образом за счет введения композиции способствовать защите субъекта от таких неблагоприятных эффектов. В определенных вариантах осуществления неблагоприятные эффекты инфекции RSV могут быть фактически предотвращены, т.е. снижены до таких низких уровней, что они не будут клинически значимыми.

В настоящем изобретении также представлена выделенная клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую F-белок RSV до слияния, где F-белок RSV до слияния содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или 2. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая F-белок RSV до слияния, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 3 или 4.

В настоящем изобретении дополнительно представлен способ получения вакцины против респираторно-синцитиального вируса (RSV), предусматривающий обеспечение рекомбинантного аденовируса человека, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV до слияния или его фрагмент, размножение указанного рекомбинантного аденовируса в культуре клеток-хозяев, выделение и очистку рекомбинантного аденовируса и составление рекомбинантного аденовируса в фармацевтически приемлемой композиции, где F-белок RSV до слияния содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или 2. В определенных вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус представляет собой аденовирус серотипов 26 или 35.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 - схематическое представление F-белка RSV. Белок-предшественник включает домены F2 и F1 и пептид p27, который удаляется в зрелых белках с помощью расщепления фуриноподобными протеазами. Сайты расщепления обозначены стрелками. Числа над прямоугольниками обозначают положение аминокислот в полноразмерном белке за исключением сигнального пептида. В F1 показаны структурные элементы: пептид слияния (FP), участок рефолдинга 1 (RR1), включающий гептадный повтор A (HRA), и участок рефолдинга 2 (RR2), включающий гептадный повтор B (HRB).

Фиг. 2 - относительная экспрессия вариантов F-белка на поверхности. Полноразмерные варианты F-белка экспрессировали в клетках HEK293T. Клетки окрашивали антителом к F RSV (CR9503) и анализировали с помощью проточной цитометрии (FACS). Значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) рассчитывали и нормализовали по MFI для контрольного образца клеток, трансфицированных F-белком дикого типа (Fwt). MFI для Fwt задавали как 1. Планки представляют средние значения, планки погрешностей представляют диапазон значений.

Фиг. 3 - фракция F-белка до слияния на поверхности клеток. Полноразмерные варианты F-белка экспрессировали в клетках HEK293T. Клетки окрашивали антителом к F RSV CR9503 и антителом к F RSV до слияния CR9501 и проводили анализ с помощью проточной цитометрии. Рассчитывали значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) и MFI, измеренную по CR9501, нормализовали относительно MFI, измеренной по CR9503. Нормализованные значения MFI указывают на фракцию pre-F на поверхности клеток. Планки представляют средние значения, планки погрешностей представляют диапазон значений.

Фиг. 4 - относительная экспрессия вариантов F-белка на поверхности. Растворимые варианты с удаленным трансмембранным участком и цитоплазматическим участком (Fsl), а также полноразмерные варианты F-белка экспрессировали в клетках HEK293T. Уровень экспрессии растворимого белка измеряли в культуральном супернатанте с помощью Octet и полноразмерные варианты тестировали с помощью окрашивания клеток с использованием антитела к F RSV (CR9503), и проводили анализ с помощью проточной цитометрии. Значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) рассчитывали и нормализовали по MFI для контрольного образца клеток, трансфицированных F-белком дикого типа (Fwt). MFI для Fwt задавали как 1. Планки представляют средние значения, планки погрешностей представляют диапазон значений.

Фиг. 5 - температурная стабильность вариантов F-белка. Полноразмерные варианты F-белка экспрессировали в клетках HEK293T. После теплового шока клетки окрашивали с помощью антитела к F

RSV (CR9501 - сплошные линии и CR9503 - прерывистые линии) и проводили анализ с помощью проточной цитометрии. Определяли процентную долю положительно окрашенных клеток. Символы представляют средние значения, планки погрешностей представляют диапазон значений. (А) Определяли процентную долю положительно окрашенных клеток. (В) Значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) рассчитывали и нормализовали по MFI для образца клеток при 37°C. MFI для образца при 37°C задавали как 1. Пунктирные линии соответствуют фоновому окрашиванию при 60°C.

Фиг. 6 - стабильность F-белков. PreF является более стабильным, чем белок FA2 в конформации до слияния, на поверхности клеток в анализе с тепловым стрессом. Клетки A549 инфицировали Ad26 и Ad35, содержащими вставку FA2 (F RSV д. т., серые прямоугольники) или стабилизированную вставку F до слияния (preF2.2, черные прямоугольники) при указанной MOI. На клетки воздействовали температурой при указанной температуре в течение 15 мин перед окрашиванием. Вверху: процентная доля клеток, на поверхности которых присутствует F до слияния (выявлено с помощью антитела CR9501); внизу: процентная доля клеток, на которых присутствует любая форма F-белка, до слияния и после слияния (выявлено с помощью антитела CR9503). Значения нормализовали по образцам при 37°C. Все планки представляют однократное измерение.

Фиг. 7 - Ad26.RSV.preF2.1 и F2.2 вызывают клеточный иммунный ответ у мышей после однократного введения. Горизонтальные планки изображают среднее геометрическое значение ответа в группе. Фоновый уровень рассчитан в виде 95% процентиля пятнообразующих единиц (ПОЕ), выявленных в нестимулированных спленоцитах, и он обозначен пунктирной линией.

Фиг. 8 - индуцирование Ad26.RSV.preF2.1 и F2.2 повышенного уровня нейтрализующих вирус антител при сравнении с Ad26.RSV.FA2 у мышей после однократной иммунизации. Мышей Balb/c (n=4 на группу) иммунизировали с помощью указанной дозы от 108 до 1010 вирусных частиц (vp) Ad26.RSV.FA2, или Ad26.RSV.preF2.1, или Ad26.RSV.preF2.2, или буфером для составления, а затем проводили анализ сыворотки крови, выделенной через 8 недель после иммунизации, на предмет гуморального иммунного ответа. (А) антитела, нейтрализующие вирус, определяли в отношении RSV A Long с использованием анализа микронейтрализации с последующим считыванием по принципу ELISA. Титры приведены в виде значения $\log_2$ от IC_{50} . (В) Титры антител к F до слияния или после слияния определяли с помощью ELISA, при этом рассчитывали соотношение антител к F до слияния и после слияния для всех образцов, продемонстрировавших титры антител к F до слияния и после слияния выше нижнего предела количественного подсчета (LLOQ). (С) ELISA для определения подклассов проводили с использованием RSV F A2 после слияния в качестве покрывающего реагента и соотношение IgG2a/IgG1 ($\log_{10}$) строили в виде графика. Соотношение, выявленное для Th1 (сыворотка крови, полученная от животных, иммунизированных с использованием аденовирусных векторов на основе экспрессии F RSV) и Th2 (сыворотка крови, полученная от животных, иммунизированных FI-RSV) референтных образцов обозначены пунктирными линиями. LLOQ обозначен пунктирными линиями (панели А), и горизонтальные планки представляют среднее значение ответов на группу.

Фиг. 9 - вызов посредством Ad26.RSV.preF2.2 иммунного ответа, с помощью которого нейтрализуется широкий диапазон изолятов RSV. Сыворотку крови мышей Balb/c, которых иммунизировали с использованием 1010 вирусных частиц (vp) Ad26.RSV.FA2 (n=3), или Ad26.RSV.preF (n=4), или буфера для составления (n=2), использовали в анализах нейтрализации вируса (анализ микронейтрализации со считыванием по принципу ELISA) с указанными штаммами RSV A (верхние панели) и B (нижние панели). Титры приведены в виде значения $\log_2 IC_{50}$, и горизонтальные планки представляют среднее значение ответа на группу. LLOQ обозначен прерывистой линией.

Фиг. 10 - защита хлопковых хомяков с помощью однократной иммунизации с использованием Ad26.RSV.preF2.2 или Ad35.RSV.preF2.2 в низких дозах от заражения гомологичным RSV A2. Хлопковых хомяков (*Sigmodon hispidus*) (n=7-9 на группу) иммунизировали указанными дозами (в vp/животное) Ad26.RSV.preF2.2, Ad26.RSV.FA2 (левые панели), Ad35.RSV.preF2.2 или Ad35.RSV.FA2 (правые панели) путем однократного внутримышечного введения. Контрольные иммунизации проводили с использованием буфера для составления, FI-RSV или интраназального применения низкой дозы RSV A2. Через семь недель после иммунизации животных интраназально заражали с использованием 10^5 БОЕ RSV A2. Титры вируса в легких (А-В) и в носовой полости (С-Д) определяли с помощью анализа бляшкообразования через 5 дней после заражения. (Е-Ф) Образцы сыворотки крови, отобранные непосредственно перед заражением, использовали для проведения анализа нейтрализации вируса с использованием штамма RSV A Long (анализ микронейтрализации со считыванием по принципу ELISA). Пунктирная линия представляет нижний предел количественного определения (LLOQ). Горизонтальные планки представляют среднее значение титра на группу.

Фиг. 11 - отсутствие увеличения баллов при гистопатологической оценке альвеолита в результате иммунизации хлопковых хомяков с использованием Ad26.RSV.preF2.2 или Ad35.RSV.preF2.2 после заражения RSV A2. Хлопковых хомяков (*Sigmodon hispidus*) (n=7-9 на группу) иммунизировали указанными дозами (в vp/животное) Ad26.RSV.preF2.2, Ad26.RSV.FA2 (верхняя панель), Ad35.RSV.preF2.2 или Ad35.RSV.FA2 (нижняя панель) путем однократного внутримышечного введения. Контрольные иммунизации проводили с использованием буфера для составления, FI-RSV или интраназального применения

низкой дозы RSV A2. Через семь недель после иммунизации животных интраназально заражали с использованием 10^5 БОЕ RSV A2. Альвеолит оценивали в баллах с помощью гистопатологической оценки одной доли легкого через 5 дней после заражения по нелинейной шкале от 0 до 4. Горизонтальная пунктирная линия обозначает максимальный балл для контрольных животных, которых предварительно подвергали воздействию RSV-A2 перед заражением для имитации природного воздействия RSV, что не приводит к ERD.

Подробное описание изобретения

RSV-вакцины, содержащие аденовирус человека, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, ранее были описаны в WO2013/139911 и WO2013/139916. В них было показано, что рекомбинантные аденовирусы серотипов 26 или 35, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV, являются высокоэффективными вакцинами против RSV в общепринятой модели хлопкового хомьяка и обладают улучшенной эффективностью при сравнении данных, ранее описанных для Ad5, кодирующего F-белок RSV. Было продемонстрировано, что однократное введение, даже при внутримышечном введении, Ad26 или Ad35, кодирующих F RSV, является достаточным, чтобы обеспечить полную защиту против заражения RSV и дальнейшей репликации.

Однако по причине нестабильности F-белка RSV F-белок RSV обладает предрасположенностью к преждевременному рефолдингу в его более стабильную конформацию после слияния. Данное явление представляет собой природное свойство белка как в растворе, так и на поверхности вирионов. В сыворотке крови человека большинство антител, нейтрализующих RSV, однако, направлено против F RSV в конформации до слияния. Поэтому в исследованиях, которые привели к появлению настоящего изобретения, была предпринята попытка идентифицировать модификации, которые стабилизируют F-белок RSV в его конформации до слияния в полноразмерном белке.

Ряд возможных мутаций, стабилизирующих F-белок RSV в конформации до слияния, ранее был описан в WO2014/174018 и WO2014/202570. Молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению кодируют F-белки RSV, содержащие уникальный и специфический набор мутаций. Согласно настоящему изобретению было показано, что данная уникальная комбинация мутаций по настоящему изобретению приводит в результате к повышению уровней экспрессии F-белка RSV и стабильности F-белка RSV в конформации до слияния. Кроме того, было показано, что молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению кодируют F-белок RSV, который стабилизирован в конформации до слияния и который индуцирует более высокие титры нейтрализующих антител по сравнению с F-белком RSV дикого типа (как раскрывается в WO2013/139911 и WO2013/139916).

Таким образом, в первом аспекте в настоящем изобретении представлены новые молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие F-белок респираторно-синцитиального вируса до слияния (F-белок RSV до слияния, или pre-F-белок RSV), где F-белок RSV до слияния содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или 2.

В определенных вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты кодируют pre-F-белки RSV под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

Используемые в данном документе термины нуклеиновая кислота, молекула нуклеиновой кислоты, нуклеиновая кислота или нуклеотидная последовательность, а также полинуклеотид используются взаимозаменяемо и все относятся к линейным биополимерам (цепям), полученным из нуклеотидов, в том числе ДНК и РНК.

Специалисту в данной области понятно, что несколько различных молекул нуклеиновой кислоты могут кодировать один и тот же полипептид в результате вырожденности генетического кода. Также понятно, что специалисты в данной области могут при помощи традиционных методик делать нуклеотидные замены, которые не влияют на полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидами, описанными в данном документе для отражения частоты использования кодонов любым конкретным организмом-хозяином, в котором полипептиды будут экспрессироваться. Следовательно, если конкретно не указано иное, то выражение "молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность" включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными вариантами друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности, которые кодируют белки и РНК, могут включать в себя интроны. В данном документе последовательности представлены в направлении от 5' до 3', как принято в данной области.

В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует фрагмент F RSV до слияния, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или 2.

В определенных вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие F-белок RSV до слияния или его фрагмент, являются кодон-оптимизированными с целью экспрессии в клетках млекопитающих, таких как клетки человека. Способы оптимизации кодонов известны и были описаны ранее (например, WO 96/09378).

В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая F-белок RSV до слияния, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 3. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая F-белок RSV, содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 4.

В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая F-белок RSV, состоит из последовательности нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 3 или 4.

Используемый в данном документе термин "фрагмент" относится к пептиду, который имеет аминоконцевую и/или карбоксиконцевую, и/или внутреннюю делецию, но в котором остальная часть аминокислотной последовательности идентична соответствующим положениям в последовательности полноразмерного F-белка RSV, например, F-белка RSV под SEQ ID NO 1 или 2. Будет понятно, что для индуцирования иммунного ответа и для целей вакцинации в целом белок не должен быть полноразмерным и не должен иметь все функции белка дикого типа, а фрагменты белка являются в равной степени применимы. Специалист в данной области также будет понимать, что в белке можно производить изменения, например, с помощью замен, делеций, добавлений аминокислот и т. д., например, используя традиционные методики молекулярной биологии. В целом, консервативные замены аминокислот можно применять без потери функции или иммуногенности полипептида. Это можно легко проверить на основе традиционных процедур, хорошо известных специалисту.

Настоящее изобретение также относится к векторам, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую F-белок RSV до слияния, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или 2, или его фрагмент.

Согласно настоящему изобретению вектор может представлять собой любой вектор, который можно легко подвергать процедурам с использованием рекомбинантной ДНК и который может вызывать экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Выбор вектора будет, как правило, зависеть от совместимости вектора с клеткой-хозяином, в которую вектор необходимо ввести.

В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный аденовирус человека, также называемый рекомбинантными аденовирусными векторами. Получение рекомбинантных аденовирусных векторов хорошо известно из уровня техники. Используемое в данном документе выражение по отношению к аденовирусу "рекомбинантный" подразумевает, что он был модифицирован человеком, например, он имеет измененные концевые участки, активно клонированные в него, и/или он содержит гетерологичный ген, то есть он не является встречающимся в природе аденовирусом дикого типа.

В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор в соответствии с настоящим изобретением является дефектным по меньшей мере по одному существенно важному функциональному гену участка E1, например, участка E1a и/или участка E1b аденовирусного генома, который требуется для вирусной репликации. В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор в соответствии с настоящим изобретением является дефектным по меньшей мере в части участка E3, не являющегося существенно важным. В определенных вариантах осуществления вектор является дефектным по меньшей мере по одному существенно важному функциональному гену участка E1 и по меньшей мере в части участка E3, не являющегося существенно важным.

Аденовирусный вектор может быть "множественно дефектным", что означает, что данный аденовирусный вектор является дефектным по одному или более существенно важным функциональным генам в каждом из двух или более участков аденовирусного генома. Например, вышеупомянутые аденовирусные векторы с дефектом по E1 или E1, с дефектом по E3 могут дополнительно являться дефектными по меньшей мере по одному существенно важному гену участка E4 и/или по меньшей мере одному существенно важному гену участка E2 (например, участка E2A и/или участка E2B).

Аденовирусные векторы, способы их конструирования и способы их размножения хорошо известны из уровня техники и описаны, например, в патентах США №№ 5559099, 5837511, 5846782, 5851806, 5994106, 5994128, 5965541, 5981225, 6040174, 6020191 и 6113913, и Thomas Shenk, "Adenoviridae and their Replication", M. S. Horwitz, "Adenoviruses", Chapters 67 and 68, respectively, in Virology, B. N. Fields et al., eds., 3d ed., Raven Press, Ltd., New York (1996), а также других источниках, упомянутых в данном документе. Как правило, конструирование аденовирусных векторов включает использование стандартных молекулярно-биологических методик, таких как описанные, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Watson et al., *Recombinant ДНК*, 2d ed., Scientific American Books (1992) и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), а также в других источниках, упомянутых в данном документе.

В определенных вариантах осуществления аденовирус представляет собой аденовирус серотипов 26 или 35 человека. Вакцины согласно настоящему изобретению на основе данных серотипов оказались более эффективными, чем вакцины, описанные в предшествующем уровне техники, которые были основаны на Ad5, поскольку те не могли обеспечивать полную защиту против репликации RSV при заражении после однократного внутримышечного введения (Kim et al., 2010, *Vaccine* 28: 3801-3808; Kohlmann et al., 2009, *J Virol* 83: 12601-12610; Krause et al., 2011, *Virology Journal* 8:375). Серотип по настоящему изобретению в целом дополнительно характеризуется низким доминированием серотипа и/или низкими титрами ранее существующих нейтрализующих антител в популяции человека. Рекомбинантные аденовирусные векторы данных серотипов с различными трансгенами оценивают в клинических испытаниях, и на сегодняшний день показано, что они имеют превосходный профиль безопасности. Получение векто-

ров на основе rAd26 описано, например, в WO 2007/104792 и в Abbink et al., (2007) *Virology* 81(9): 4654-63. Иллюстративные последовательности генома Ad26 находятся в GenBank под номером доступа EF 153474 и под SEQ ID NO: 1 в WO 2007/104792. Получение векторов rAd35 описано, например, в патенте США № 7270811, в WO 00/70071 и в Vogels et al., (2003) *J Virol* 77(15): 8263-71. Иллюстративные последовательности генома Ad35 находятся в GenBank под номером доступа AC_000019 и на фиг. 6 из WO 00/70071.

Рекомбинантный аденовирус в соответствии с настоящим изобретением может быть компетентным по репликации или дефектным по репликации. В определенных вариантах осуществления аденовирус является дефектным по репликации, например, потому, что он содержит делецию в участке E1 генома. Как известно специалисту, в случае делеций существенно важных участков из генома аденовируса функциональные элементы, кодируемые этими участками, должны быть обеспечены в транс-положении, предпочтительно клеткой-продуцентом, т.е., если части или целые участки E1, E2 и/или E4 удалены из аденовируса, то они должны присутствовать в клетке-продуценте, например, быть встроенными в ее геном или находиться в форме так называемого вспомогательного аденовируса или вспомогательных плазмид. Аденовирус также может содержать делецию в участке E3, который не является существенным для репликации, и, следовательно, такую делецию не следует комплементировать.

Клетка-продуцент (также иногда называемая в данной области и в данном документе как "пакующая клетка", или "комплементирующая клетка", или "клетка-хозяин"), которую можно использовать, может представлять собой любую клетку-продуцент, в которой требуемый аденовирус может быть размножен. Например, размножение векторов на основе рекомбинантного аденовируса осуществляют в клетках-продуцентах, которые комплементируют дефекты в аденовирусе. Предпочтительно такие клетки-продуценты содержат в своем геноме по меньшей мере последовательность E1 аденовируса, и таким образом они способны к комплементированию рекомбинантных аденовирусов с делецией в участке E1. Можно использовать любую E1-комплементирующую клетку-продуцент, например, клетки сетчатки глаза человека, иммортализованные с помощью E1, например, клетки 911 или PER.C6 (см. патент США № 5994128), E1-трансформированные амниоциты (см. патент EP № 1230354), E1-трансформированные клетки A549 (см., например, WO 98/39411, патент США № 5891690), GH329:HeLa (Gao et al., 2000, *Human Gene Therapy* 11: 213-219), 293 и т. п. В определенных вариантах осуществления клетками-продуцентами являются, например, клетки HEK293, или клетки PER.C6, или клетки 911, или клетки IT293SF и им подобные.

Для E1-дефектных аденовирусов, не относящихся к подгруппе C, таких как Ad35 (подгруппа B) или Ad26 (подгруппа D), предпочтительной является замена кодирующей последовательности E4-orf6 этих аденовирусов, не относящихся к подгруппе C, на E4-orf6 аденовируса подгруппы C, такого как Ad5. Это обеспечивает возможность размножения таких аденовирусов в хорошо известных комплементирующих линиях клеток, которые экспрессируют гены E1 из Ad5, таких как клетки 293 или клетки PER.C6 (см., например, Havenga et al., 2006, *J. Gen. Virol.* 87: 2135-2143; WO 03/104467, включенные в данный документ во всей своей полноте с помощью ссылки). В определенных вариантах осуществления аденовирус, который можно использовать, представляет собой аденовирус человека серотипа 35 с делецией в участке E1, в который была клонирована нуклеиновая кислота, кодирующая антиген белка F RSV, и с участком E4 orf6 из Ad5. В определенных вариантах осуществления аденовирус в вакцинной композиции по настоящему изобретению представляет собой аденовирус человека серотипа 26 с делецией в участке E1, в который была клонирована нуклеиновая кислота, кодирующая антиген белка F RSV, и с участком E4 orf6 из Ad5.

В альтернативных вариантах осуществления отсутствует необходимость помещать гетерологичный участок E4orf6 (например, из Ad5) в аденовирусный вектор, а вместо этого E1-дефектный вектор, не относящийся к подгруппе C, размножают в линии клеток, которые экспрессируют как E1, так и совместимый E4orf6, например, в линии клеток 293-ORF6, которые экспрессируют как E1, так и E4orf6 из Ad5 (см., например, Brough et al., 1996, *J Virol* 70: 6497-501, в которой описано получение клеток 293-ORF6; Abrahamsen et al., 1997, *J Virol* 71: 8946-51 и Nan et al., 2003, *Gene Therapy* 10: 326-36, в каждой из которых описано получение не относящихся к подгруппе C аденовирусных векторов с удаленным E1).

В качестве альтернативы можно использовать комплементирующую клетку, которая экспрессирует E1 из серотипа, подлежащего размножению (см., например, WO 00/70071, WO 02/40665).

Для аденовирусов подгруппы B, таких как Ad35, с делецией в участке E1 предпочтительным является сохранение 3'-конца открытой рамки считывания E1B 55K в аденовирусе, например, 166 п. о., расположенных непосредственно выше открытой рамки считывания pIX, или фрагмента, включающего их, например, фрагмента из 243 п. о., расположенного непосредственно выше старт-кодона pIX (ограниченных на 5'-конце сайтом рестрикции Bsu361 в геноме Ad35), так как это повышает стабильность аденовируса, потому что промотор гена pIX частично расположен в данной области (см., например, Havenga et al., 2006, *J. Gen.* 87: 2135-2143; WO 2004/001032, включенные в данный документ посредством ссылки).

"Гетерологичная нуклеиновая кислота" (также называемая в данном документе "трансгеном") в аденовирусах по настоящему изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту, которая в естественных условиях не присутствует в аденовирусе. Ее вводят в аденовирус с помощью, например, стан-

дартных методик молекулярной биологии. В настоящем изобретении гетерологичная нуклеиновая кислота кодирует pre-F-белок RSV (или его фрагмент), содержащий последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1 или 2. Например, ее можно клонировать в удаленный участок E1 или E3 аденовирусного вектора. Трансген обычно функционально связан с последовательностями, контролирующими экспрессию. Это можно осуществить, например, путем помещения нуклеиновой кислоты, кодирующей трансген(трансгены), под контроль промотора. Можно добавлять дополнительные регуляторные последовательности. Для экспрессии трансгена(трансгенов) можно использовать множество промоторов, и они известны специалистам в данной области. Неограничивающим примером подходящего промотора для получения экспрессии в эукариотических клетках является промотор CMV (US 5385839), например, промотор гена немедленного раннего ответа CMV, например, содержащий нуклеотиды от -735 до +95 из энхансера/промотора гена немедленного раннего ответа CMV. Сигнал полиаденилирования, например, сигнал полиА гена бычьего гормона роста (US 5122458), может располагаться позади трансгена(трансгенов).

В определенных вариантах осуществления рекомбинантные аденовирусные векторы по настоящему изобретению содержат в качестве 5'-концевых нуклеотидов нуклеотидную последовательность: СТАТСТАТ. Данные варианты осуществления являются преимущественными, поскольку такие векторы демонстрируют улучшенную репликацию в способах получения, что в результате дает партии аденовируса с улучшенной гомогенностью по сравнению с векторами, имеющими исходные 5'-концевые последовательности (обычно САТСАТСА) (см. также патентные заявки под №№ PCT/EP2013/054846 и US 13/794318, под заголовком "Партии рекомбинантного аденовируса с измененными терминальными концами" ('Batches of recombinant adenovirus with altered terminal ends'), поданные 12 марта 2012 года от имени Crucell Holland B.V.), включенные в данный документ посредством ссылки во всей их полноте. Таким образом, в настоящем изобретении также представлены партии рекомбинантного аденовируса, кодирующего F-белок RSV или его часть, где F-белок RSV содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или 2, и где фактически все (например, по меньшей мере 90%) аденовирусы в партии содержат геном с концевой нуклеотидной последовательностью СТАТСТАТ.

В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты может кодировать фрагмент F-белка RSV до слияния. Фрагмент может представлять собой результат какой-либо одной или обеих из аминоконцевой и карбоксиконцевой делеций. Размер делеции может определять специалист в данной области, например, для достижения лучшего выхода рекомбинантного аденовируса. Будет выбран такой фрагмент, который включает иммунологически активный фрагмент F-белка, т.е. часть, которая будет вызывать иммунный ответ у субъекта. Его можно легко определить с применением способов *in silico*, *in vitro* и/или *in vivo*, все из которых хорошо известны специалисту.

Кроме того, в настоящем изобретении представлены композиции, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую F-белок RSV до слияния, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или 2.

Также в настоящем изобретении представлены композиции, содержащие описанный в данном документе вектор.

В определенных вариантах осуществления композиции, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор, предназначены для применения в снижении тяжести инфекции и/или репликации RSV у субъекта. В определенных предпочтительных вариантах осуществления композиции предназначены для применения в качестве вакцины против RSV. Термин "вакцина" относится к средству или композиции, содержащим активный компонент, эффективный для индуцирования у субъекта на терапевтическом уровне иммунитета против определенных патогена или заболевания. В настоящем изобретении вакцина содержит эффективное количество молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует F-белок RSV до слияния, содержащий SEQ ID NO: 1 или 2, или его антигенный фрагмент, что обуславливает иммунный ответ на F-белок RSV. Это обеспечивает способ предупреждения возникновения тяжелого заболевания нижних дыхательных путей, приводящего к госпитализации, и снижает частоту осложнений, таких как пневмония и бронхолит, вследствие инфекции и репликации RSV у субъекта. Таким образом, в настоящем изобретении также представлен способ предупреждения или уменьшения интенсивности тяжелого заболевания нижних дыхательных путей, предупреждения или уменьшения (например, сокращения длительности) госпитализации и/или уменьшения частоты и/или тяжести пневмонии или бронхолита, вызванных RSV у субъекта, предусматривающий введение субъекту композиции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую pre-F-белок RSV или его фрагмент, где F-белок RSV содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или 2. Термин "вакцина" согласно настоящему изобретению подразумевает, что она представляет собой фармацевтическую композицию и, таким образом, как правило, включает фармацевтически приемлемые разбавитель, носитель или вспомогательное вещество. 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.

В определенных вариантах осуществления композиции, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, дополнительно содержат один или более адъювантов, или их вводят вместе с ними. Адъ-

юванты, известные в данной области, для дополнительного повышения иммунного ответа на используемую антигенную детерминанту, и фармацевтические композиции, содержащие аденовирус и подходящие адъюванты, раскрыты, например, в WO 2007/110409, включенной в данный документ посредством ссылки. Термины "адъювант" и "иммуностимулятор" используются в данном документе взаимозаменяемо, и их определяют как одно или более веществ, вызывающих стимуляцию иммунной системы. В данном контексте адъюванты используют для усиления иммунного ответа к F-белкам RSV до слияния по настоящему изобретению. Примеры подходящих адъювантов включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия; композиции на основе масляной эмульсии (или композиции масло-в-воде), в том числе эмульсии сквалена в воде, например, MF59 (см., например, WO 90/14837); составы на основе сапонины, такие как, например, QS21 и иммуностимулирующие комплексы (ISCOM) (см., например, US 5057540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); производные бактерий или микроорганизмов, примерами которых являются монофосфориллипид А (MPL), 3-О-деацетилованный MPL (3dMPL), олигонуклеотиды, содержащие мотив CpG, ADP-рибозилированные бактериальные токсины или их мутанты, такие как термолabileный энтеротоксин LT E. coli, холерный токсин СТ и им подобные. Также возможно использование адъюванта, кодируемого вектором, например, путем использования гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая кодирует слияние домена олигомеризации C4-связывающего белка (C4bp) с антигеном, представляющим интерес (например, Solabomi et al., 2008, Infect Immun 76: 3817-23). 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 на дозу.

В других вариантах осуществления композиции не содержат адъюванты.

Согласно настоящему изобретению также можно вводить дополнительные активные компоненты в комбинации с композициями, например, вакцинами, согласно настоящему изобретению. Такие дополнительные активные компоненты могут включать, например, другие антигены RSV или векторы, содержащие кодирующую их нуклеиновую кислоту. Такие векторы могут, опять же, не относиться к аденовирусным или являться аденовирусными, из которых последние могут относиться к любому серотипу. Пример других антигенов RSV включает F- или G-белок RSV или его иммунологически активные части. Например, интраназально применяемый рекомбинантный дефектный по репликации аденовирусный вектор rAd/3xG на основе Ad5, экспрессирующий растворимый коровий домен гликопротеина G (аминокислоты 130-230), обеспечивал защиту в мышинной модели (Yu et al., 2008, J Virol 82: 2350-2357), и хотя он не обеспечивал защиту при внутримышечном введении, из этих данных ясно, что G RSV представляет собой подходящий антиген для индуцирования защитных ответов. Дополнительные активные компоненты могут также включать антигены, не относящиеся к RSV, например, происходить от других патогенов, таких как вирусы, бактерии, паразиты и им подобных. Введение дополнительных активных компонентов можно, например, осуществлять путем введения по отдельности или путем введения комбинации продуктов из вакцин по настоящему изобретению и дополнительных активных компонентов. В определенных вариантах осуществления осуществления дополнительных антигенов, не относящихся к аденовирусам (кроме RSV.F), могут быть закодированы в векторах по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления может потребоваться экспрессия более одного белка из одного аденовируса, и в таких случаях, например, можно связывать больше кодирующих последовательностей для образования одного транскрипта из одной кассеты экспрессии, или они могут присутствовать в двух отдельных кассетах экспрессии, клонированных в различные части аденовирусного генома.

Композиции по настоящему изобретению, например, композиции на основе аденовируса, можно вводить субъекту, например субъекту-человеку. Общая доза аденовируса, обеспечиваемая субъекту при однократном введении, может варьировать, как известно практикующему врачу, и, как правило, составляет от 1×10^7 вирусных частиц (vp) до 1×10^{12} vp, предпочтительно от 1×10^8 vp до 1×10^{11} vp, например, от 3×10^8 до 5×10^{10} vp, например, от 10^9 до 3×10^{10} vp.

Введение композиций можно осуществлять с использованием стандартных путей введения. Неограничивающие варианты осуществления включают парентеральное введение, такое как инъекция, например, внутрикожная, внутримышечная и т. д., или подкожное, чрескожное введение, или введение через слизистые, например, интраназальное, пероральное и им подобные. В целом было отмечено, что интраназальное введение является предпочтительным путем для вакцин против RSV. Наиболее важным преимуществом интраназальной стратегии с живыми вирусами является непосредственная стимуляция местного иммунитета в дыхательных путях и отсутствие ассоциированного усиления заболевания. Единственными вакцинами для применения в педиатрии, проходящими в настоящее время клинические исследования, являются живые интраназальные вакцины (Collins and Murphy. Vaccines against human respiratory syncytial virus. B: Perspectives in Medical Virology 14: Respiratory Syncytial Virus (Ed. Cane, P.), Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, pp233-277). Интраназальное введение также представляет собой подходящий предпочтительный путь согласно настоящему изобретению. Преимущество внутримышечного введения заключается в том, что оно является простым и надежным и не несет риска в отношении безо-

пасности при интраназальном введении у детей младше 6 месяцев. В одном варианте осуществления композицию вводят путем внутримышечной инъекции, например, в дельтовидную мышцу руки или латеральную широкую мышцу бедра. Специалисту известны различные варианты введения композиции, например, вакцины, для индуцирования иммунного ответа к антигену (антигенам), присутствующему(им) в вакцине.

Субъект, как используется в данном документе, предпочтительно представляет собой млекопитающее, например, грызуна, например, мышшь, хлопкового хомяка или примата, отличного от человека, или человека. Предпочтительно субъектом является субъект-человек. Субъект может быть любого возраста, например, от приблизительно 1 месяца до 100 лет, например, от приблизительно 2 месяцев до приблизительно 80 лет, например, от приблизительно 1 месяца до приблизительно 3 лет, от приблизительно 3 лет до приблизительно 50 лет, от приблизительно 50 лет до приблизительно 75 лет и т. д.

Также возможным является обеспечение одного или более бустерных введений одной или более композиций, например, вакцин, по настоящему изобретению. При проведении бустерной вакцинации, как правило, 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 (что в данном случае называется "примирующей вакцинацией"). В альтернативных бустерных схемах после примирующей вакцинации также субъекту можно вводить различные векторы, например, один или более аденовирусов различных серотипов, или другие векторы, такие как MVA, или ДНК, или белок. Например, можно вводить субъекту рекомбинантный аденовирусный вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую F-белок RSV до слияния в качестве примирующего антигена, и осуществлять бустерную иммунизацию с использованием композиции, содержащей F-белок RSV. В определенных вариантах осуществления F-белок RSV также стабилизирован в конформации до слияния.

В определенных вариантах осуществления введение включает примирующее и по меньшей мере одно бустерное введение. В определенных вариантах осуществления композицию вводят в качестве примирующей композиции и/или в качестве бустерной композиции согласно схеме примирующей-бустерной вакцинации. В соответствующих определенных вариантах осуществления примирующее введение осуществляют с использованием rAd35, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую pre-F-белок RSV или его фрагмент (rAd35-RSV.pre-F), где pre-F-белок RSV содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или 2, а бустерное введение осуществляют с использованием rAd26, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV (rAd26-RSV.pre-F), где pre-F-белок RSV содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или 2. В соответствующих других вариантах осуществления примирующее введение осуществляют с использованием rAd26-RSV.pre-F, а бустерное введение осуществляют с использованием rAd35-RSV.pre-F. В других вариантах осуществления и примирующее, и бустерное введения осуществляют с использованием rAd26-RSV.pre-F. В определенных вариантах осуществления примирующее введение осуществляют с использованием rAd26-RSV.pre-F или rAd35-RSV.pre-F, а бустерное введение осуществляют с использованием F-белка RSV. Во всех этих вариантах осуществления можно обеспечивать дополнительные бустерные введения при помощи одного и того же или других векторов или белка. Варианты осуществления, в которых осуществление бустерного введения при помощи F-белка RSV может быть особенно полезным, включают, например, у пожилых субъектов из групп риска (например, с COPD или астмой) возрастом 50 лет или старше, или, например, у здоровых субъектов 60 лет или старше или 65 лет или старше.

В определенных вариантах осуществления введение предусматривает однократное введение композиции согласно настоящему изобретению без дополнительных (бустерных) введений. Такие варианты осуществления являются предпочтительными с точки зрения снижения сложности и стоимости схемы с однократным введением по сравнению со схемой примирующей-бустерной иммунизации. Полная защита наблюдается уже после однократного введения рекомбинантных аденовирусных векторов по настоящему изобретению без бустерных введений на модели хлопкового хомяка в примерах в данном документе.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении представлены способы получения вакцины против респираторно-синцитиального вируса (RSV), предусматривающие обеспечение рекомбинантного аденовируса человека, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую F-белок RSV или его фрагмент, размножение указанного рекомбинантного аденовируса в культуре клеток-хозяев, выделение и очистку рекомбинантного аденовируса и составление рекомбинантного аденовируса в фармацевтически приемлемую композицию, где F-белок RSV содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или 2.

Рекомбинантный аденовирус можно получать и размножать в клетках-хозяевах в соответствии с хорошо известными способами, которые предусматривают клеточную культуру клеток-хозяев, которые инфицируют аденовирусом. Клеточная культура может представлять собой любой тип клеточной культуры, в том числе адгезивную клеточную культуру, например, клетки, прикрепленные к поверхности культурального флакона или к микроносителям, а также суспензионную культуру.

Манипуляции с суспензионными культурами в наиболее крупном масштабе проводят в периодическом процессе или процессе с подпиткой, поскольку они являются наиболее простыми для управления и

увеличения масштаба. В настоящее время более распространенными становятся непрерывные процессы на основе принципов перфузии, и они также являются подходящими (см., например, WO 2010/060719 и WO 2011/098592, оба из которых включены в данный документ посредством ссылки, в которых описаны подходящие способы получения и очистки больших количеств рекомбинантных аденовирусов).

Клетки-продуценты культивируют для увеличения количества клеток и вирусов и/или титров вирусов. Культивирование клетки выполняют с обеспечением ей возможности метаболизма, и/или роста, и/или деления, и/или продуцирования вируса, представляющего интерес в соответствии с настоящим изобретением. Этого можно достичь с помощью способов, которые по сути хорошо известны специалистам в данной области, и это включает без ограничений обеспечение питательных веществ для клетки, например, в соответствующих питательных средах. Подходящие питательные среды хорошо известны специалистам в данной области и могут, как правило, быть получены в больших количествах из коммерческих источников 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 (см., например, Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973), и R.I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, fourth edition (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9).

Как правило, аденовирус будут подвергать воздействию соответствующей клетки-продуцента в культуре, обеспечивая возможность поглощения вируса. Обычно оптимальное перемешивание осуществляется от приблизительно 50 до 300 об./мин, как правило, приблизительно 100-200, например, приблизительно 150, как правило, DO составляет 20-60%, например, 40%, оптимальный pH составляет от 6,7 до 7,7, оптимальная температура составляет от 30 до 39°C, например, 34-37°C, оптимальная MOI составляет от 5 до 1000, например, приблизительно 50-300. Как правило, аденовирус инфицирует клетки-продуценты спонтанно, и приведение в контакт клеток-продуцентов с частицами гAd является достаточным для инфекции клеток. Обычно посевной материал аденовируса добавляют в культуру для инициации инфекции, и в дальнейшем аденовирус размножается в клетках-продуцентах. Все это является обычным для специалиста в данной области.

После инфицирования аденовирусом вирус реплицируется внутри клетки и таким образом амплифицируется - процесс, называемый в данном документе размножением аденовируса. В итоге аденовирусная инфекция приводит к лизису инфицированной клетки. Следовательно, литические характеристики аденовируса обеспечивают возможность получения вируса двумя различными способами. Первый способ представляет собой сбор вируса до лизиса клетки с использованием внешних факторов для лизирования клетки. Второй способ представляет собой сбор вирусного супернатанта с (практически) полным лизисом клетки продуцируемым вирусом (см., например, патент США № 6485958, в котором описан сбор аденовируса без лизиса клеток-хозяев с помощью внешнего фактора). Предпочтительным является применение внешних факторов для активного лизирования клеток для сбора аденовируса.

Способы, которые можно использовать для активного лизиса клетки, известны специалисту в данной области, и они рассмотрены, например, в WO 98/22588, р. 28-35. Применимыми в этом отношении способами являются, например, замораживание-размораживание, разрушение клеток абразивными материалами, гипертонический и/или гипотонический лизис, жидкий сдвиг, разрушение ультразвуком, экстракция под высоким давлением, лизис детергентом, комбинации вышеперечисленных и им подобные. В одном варианте осуществления настоящего изобретения клетки лизируют с использованием по меньшей мере одного детергента. Преимущество использования детергента для лизиса заключается в том, что этот способ простой и его легко масштабировать.

Детергенты, которые можно использовать, и способ их применения в целом известны специалисту в данной области. Например, несколько примеров рассматриваются в WO 98/22588, р. 29-33. Детергенты могут включать анионные, катионные, цвиттер-ионные и неионогенные детергенты. Концентрацию детергента можно варьировать, например, в диапазоне приблизительно 0,1-5% (вес./вес.). В одном варианте осуществления используемым детергентом является Triton X-100.

Нуклеазы можно использовать для удаления загрязняющих, т.е. главным образом из клетки-продуцента, нуклеиновых кислот. Иллюстративные нуклеазы, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают Benzonase®, Pulmozyme® или любую другую ДНКазу и/или РНКазу, широко используемые в данной области. В предпочтительных вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Benzonase®, которая быстро гидролизует нуклеиновые кислоты путем гидролиза внутренних фосфодиэфирных связей между определенными нуклеотидами, за счет чего тем самым уменьшается вязкость клеточного лизата. Benzonase® коммерчески доступна от Merck KGaA (код W214950). Концентрация, при которой используют нуклеазу, предпочтительно находится в диапазоне 1-100 ед./мл. В качестве альтернативы или дополнительно к обработке нуклеазой также можно селективно осаждать ДНК клетки-хозяина из препаратов аденовируса в ходе очистки аденовируса с использованием селективных осаждающих средств, таких как домифена бромид (см., например, US 7326555; Goerke et al., 2005, Biotechnology and bioengineering, Vol. 91: 12-21; WO 2011/045378; WO 2011/045381).

Способы сбора аденовируса из культур клеток-продуцентов подробно описаны в WO 2005/080556.

В определенных вариантах осуществления собранный аденовирус дополнительно очищают. Очистку аденовируса можно осуществлять в несколько этапов, предусматривающих осветление, ультрафильтрацию, диафильтрацию или разделение с помощью хроматографии, как описано, например, в WO 05/080556, включенном в данный документ посредством ссылки. Осветление можно осуществлять с помощью этапа фильтрации, удаляя клеточный детрит и другие примеси из клеточного лизата. Ультрафильтрацию используют для концентрирования раствора вируса. Диафильтрация или замена буфера с использованием ультрафильтров представляет собой способ удаления или замены солей, Сахаров и им подобных. Специалист в данной области знает, как подобрать оптимальные условия для каждого этапа очистки. Также в WO 98/22588, включенном в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, описаны способы получения и очистки аденовирусных векторов. Способы предусматривают выращивание клеток-хозяев, инфицирование клеток-хозяев аденовирусами, сбор и лизирование клеток-хозяев, концентрирование неочищенного лизата, замену буфера в неочищенном лизате, обработку лизата нуклеазой и дополнительную очистку вируса с использованием хроматографии.

Предпочтительно при очистке используется по меньшей мере один этап хроматографии, как, например, рассматривается в WO 98/22588, р. 61-70. Описано много способов дополнительной очистки аденовирусов, где в способ включены этапы хроматографии. Специалист в данной области будет осведомлен о данных способах и может вносить изменения в правильный способ применения хроматографических стадий для оптимизации способа. Например, возможна очистка аденовирусов с помощью этапов анионообменной хроматографии, см., например, WO 2005/080556 и Konz et al., 2005, Hum Gene Ther 16: 1346-1353. Было описано много других способов очистки аденовируса, и они доступны специалисту. Дополнительные способы получения и очистки аденовирусов раскрыты, например, в (WO 00/32754; WO 04/020971; US 5837520; US 6261823; WO 2006/108707; Konz et al., 2008, Methods Mol Biol 434: 13-23; Altaras et al., 2005, Adv Biochem Eng Biotechnol 99: 193-260), при этом все включены в данный документ посредством ссылки.

Для введения людям в настоящем изобретении могут применяться фармацевтические композиции, содержащие гAd и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. В настоящем контексте термин "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель или вспомогательное вещество в используемых дозах и концентрациях не вызовет каких-либо нежелательных или неблагоприятных эффектов у субъектов, которым их вводят. Такие фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные вещества хорошо известны из уровня техники (см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). Очищенный гAd предпочтительно составляют и вводят в виде стерильного раствора, хотя также возможно применение лиофилизированных препаратов. Стерильные растворы получают с помощью стерилизующей фильтрации или с помощью других способов, известных per se в данной области. Затем растворы лиофилизируют или заполняют ими контейнеры, предназначенные для лекарственных форм. Показатель pH раствора обычно находится в диапазоне от pH 3,0 до 9,5, например, от pH 5,0 до 7,5. Как правило, гAd находится в растворе с подходящим фармацевтически приемлемым буфером, при этом раствор гAd может также содержать соль. Необязательно может присутствовать стабилизирующее средство, такое как альбумин. В определенных вариантах осуществления добавляют детергент. В определенных вариантах осуществления гAd можно составлять в виде инъекционного препарата. Данные составы, содержащие эффективные количества гAd, являются либо стерильными жидкими растворами, жидкими суспензиями, либо лиофилизированными вариантами и необязательно содержат стабилизаторы или вспомогательные вещества. Также аденовирусная вакцина может быть в виде аэрозоля для интраназального введения (см., например, WO 2009/117134).

Например, аденовирус можно хранить в буфере, который также используют для Adenovirus World Standard (Hoganson et al., Development of a stable adenoviral vector formulation, Bioprocessing March 2002, p. 43-48): 20 mM Tris с pH 8, 25 mM NaCl, 2,5% глицерина. Другой применимый буфер для составления, подходящий для введения людям, представляет собой 20 mM Трис, 2 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, 10% вес./об. сахарозы, 0,02% вес./об. полисорбата-80. Безусловно можно использовать множество других буферов, при этом некоторые примеры подходящих составов для хранения и для фармацевтического введения препаратов очищенного (адено)вируса можно, например, найти в Европейском патенте № 0853660, патенте США № 6225289 и в международных заявках на патент WO 99/41416, WO 99/12568, WO 00/29024, WO 01/66137, WO 03/049763, WO 03/078592, WO 03/061708.

Настоящее изобретение дополнительно пояснено в следующих примерах. Примеры не ограничивают данное изобретение каким-либо образом. Они служат лишь для объяснения данного изобретения.

Примеры

Пример 1. Стабилизация F-белка RSV в его конформации до слияния.

Синтезировали плазмиды, кодирующие основные последовательности F RSV, и аминокислотные замены вводили в белок путем сайт-направленного мутагенеза. Варианты белка временно экспрессировали в клетках HEK293. Относительную экспрессию белка на поверхности клетки оценивали с помощью проточной цитометрии. Стабильность F-белков в конформации до слияния оценивали в анализе термостабильности.

Информацию о последовательности белка, используемой для вариантов F-белка RSV A2, получали из GenBank под номером доступа ACO83301.1. Аминокислотные замены вводили в последовательность с помощью сайт-направленного мутагенеза (набор QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent technologies). Праймеры для мутагенеза конструировали с использованием функционирующей в режиме онлайн программы PrimerX. Клетки HEK293T (CRL-11268) приобретали в Американской коллекции тканевых культур и культивировали при стандартных для клеточных культур условиях (37°C, 10% CO₂).

Антитела CR9501 и CR9503 на основе полностью гуманизированного IgG1 к F-белку RSV конструировали путем клонирования переменных участков тяжелой (VH) и легкой цепей (VL) в вектор для экспрессии IgG1. Клетки PER.C6® (Crucell) трансфицировали с использованием конструкций для экспрессии IgG1 и экспрессированные антитела очищали от культурального супернатанта с использованием хроматографии POROS Mabcapture A (Applied Biosystems), а затем проводили замену буфера на 50 mM NaAc, 50 mM NaCl, pH 5,5. Концентрацию антитела измеряли по оптическому поглощению при 280 нм. Количество антитела также подтверждали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC), SDS-PAGE и изоэлектрического фокусирования. Антитело CR9501 содержит участки VH и VL из 58C5 (описанные в WO2011/020079), которое специфически связывается с F-белком RSV в его конформации до слияния, но не в конформации после слияния. CR9503 содержит участки VH и VL из мотавизумаба, которое распознает F RSV в конформации как до слияния, так и после слияния.

Экспрессия белка и тепловая обработка.

Плазмидами временно трансфицировали адгезивные клетки HEK293T с использованием трансфекционных реагентов 293fectine (кат. № 12347-019) (Life Technologies) согласно рекомендациям поставщика. Через 48 ч после трансфекции клетки собирали путем их отслоения с помощью EDTA-содержащего буфера для FACS (без трипсина, см. следующий раздел) и на клеточную суспензию воздействовали теплом в течение 10 мин или на водяной бане, или в блоке для ПЦР для проведения экспериментов по термостабильности. После тепловой обработки осуществляли подготовку клеток для анализа с помощью проточной цитометрии.

С целью анализа экспрессии F-белков в аденовирусах клетки A549 инфицировали вирусом Ad26 при MOI 10000 или 5000 и вирусом Ad35 при MOI 5000, 2500 или 1250. Через 48 ч клетки отслаивали и подвергали тепловой обработке в течение 15 мин при 37°C, 50°C и 56°C. При тепловой обработке клетки окрашивали с использованием CR9501-Alexa647 или CR9503-Alexa647 и пропидия йодида (PI). После окрашивания клетки фиксировали и проводили их анализ с использованием анализатора клеток BD FACS CANTO II.

Анализ на основе проточной цитометрии.

Для каждой группы окрашивания включали следующие контроли: 1) образец отрицательного контроля, т.е. клетки, которые не подвергали какой-либо обработке и не окрашивали каким-либо антителом, меченным флуорофором; 2) образцы положительного контроля, т.е. клетки, которые окрашивали только одним флуорофором (один из которых использовали для эксперимента).

Клетки ресуспендировали в буфере для проточной цитометрии (буфер FC, 5 mM EDTA, 1% FBS в PBS) и распределяли в объемах по 50 мкл клеточной суспензии на лунку в 96-луночном планшете с крышкой (планшеты с U- или V-образной формой лунок). Двухэтапные или одноэтапные протоколы использовали для окрашивания.

В случае применения двухэтапного протокола добавляли 50 мкл первых Ab (или буфера для отрицательных контролей) в лунки и инкубировали при к.т. в течение 30 мин. Биотинилированные CR9501 и CR9503 использовали при 2 мкг/мл (конечная концентрация в лунке 1 мкг/мл). После инкубации клетки промывали 2 раза FC-буфером. Затем 50 мкл стрептавидина-APC (Molecular Probes кат. № SA1005, 0,1 мг/мл используют при 1:100) или буфера для отрицательных контролей вносили в лунки и инкубировали при к.т. в течение 30 мин. Клетки снова промывали 2 раза FC-буфером. После последней промывки клетки ресуспендировали в 100 мкл FC-буфера +/- окрашивание на присутствие живых и мертвых клеток (PI от Invitrogen, кат. № P1304MP, использовали при 2 мкг/мл) и инкубировали при к.т. в течение 15 мин. Клетки центрифугировали при 200g (1000 об./мин) в течение 5 мин, буфер с PI удаляли и клетки ресуспендировали в 150 мкл FC-буфера.

В случае одноэтапного протокола антитела CR9501 и CR9503 метили флуоресцентным зондом Alexa647 (Molecular Probes, кат. № A-20186) согласно инструкциям производителя. Клетки окрашивали согласно протоколу выше, исключая этап со стрептавидином-APC.

В популяции живых клеток определяли процентную долю клеток, положительных в отношении связывания с антителом CR9501/CR9503. Клетки, положительные по связыванию с CR9503, экспрессировали F-белок RSV на своей поверхности. Клетки, положительные по связыванию с CR9501, экспрессировали F-белок RSV до слияния на своей поверхности.

Интенсивность окрашивания антител (средняя интенсивность флуоресценции - MFI) пропорциональна количеству F-белка на поверхности клетки. MFI рассчитывали для популяции живых клеток, экспрессирующих F-белок.

Результаты.

Экспрессия вариантов полноразмерного F-белка на поверхности клеток.

Ранее идентифицированный набор мутаций, которые повышают экспрессию или стабильность эктодомена F-белка RSV в конформации до слияния, вводили в последовательность полноразмерного F RSV A2 дикого типа (Genbank, номер доступа ACO83301). Мутации вводили по отдельности или во множестве комбинаций и оценивали их влияние на экспрессию белка и стабильность.

Уровень экспрессии белка измеряли в виде среднего значения интенсивности флуоресценции (MFI) с помощью проточной цитометрии после окрашивания антителом CR9503, которое распознает F-белок как до, так и после слияния. Комбинация из двух аминокислотных замен, которые ранее были описаны для стабилизации растворимого pre-F-белка RSV (т.е. N67I и S215P) также повышала уровень экспрессии полноразмерного F-белка RSV в 2,3 раза по сравнению с полноразмерным F RSV дикого типа (фиг. 2).

Наиболее значимое повышение экспрессии наблюдали для вариантов с объединенными 3 аминокислотными заменами. Примечательно, что комбинация из более чем трех мутаций в одном варианте дополнительно не повышала экспрессию белка. Причиной может быть ограниченная способность клеточной мембраны к размещению множества копий F-белка.

Количество F до слияния на поверхности клетки оценивали путем окрашивания антителом CR9501, специфичным к белку до слияния (фиг. 3). Трансфекция клеток всеми вариантами F приводила в результате к более или менее сходному количеству F-белка до слияния на поверхности клеток. Присутствие трансмембранного домена стабилизирует полноразмерный белок до определенной степени и, следовательно, отличия в стабильности в конформации до слияния не являются очевидными при условиях окружающей среды между полноразмерными F-белками. Таким образом, анализ термостабильности разработали с целью лучшего определения различия в стабильности полноразмерных вариантов, как описано ниже.

Штамм A2, который использовали в качестве родительской последовательности для ранее описанных вариантов F-белка (WO2014/174018 и WO2014/202570), представляет собой лабораторный штамм, адаптированный на линии клеток, в котором собраны две уникальные и редкие мутации (т.е. лизин 66 и изолейцин 76). В настоящем изобретении два данных остатка подвергали мутации для того, чтобы соответствовать природным клиническим изолятам (K66E, I76V). Мутации K66E и I76V были включены в выбранные конструкции белка. По сравнению с вариантами Lys66 и Ile76 варианты с глутаматом в положении 66 (K66E) проявляют тенденцию к несколько более высокой экспрессии. Добавление валина к остатку в положении 76 (двойная замена K66E и I76V) не влияет на уровень экспрессии по сравнению с вариантами, содержащими только замену K66E (фиг. 4).

Стабильность вариантов полноразмерного F-белка на поверхности клеток.

В условиях окружающей среды на протяжении короткого периода времени значимого отличия в стабильности конформации до слияния между вариантами полноразмерного F по сравнению с различными комбинациями стабилизирующих мутаций не выявили. Известно, что повышенная температура является эффективным *in vitro* триггером для рефолдинга F-белка RSV от конформации до слияния в конформацию после слияния. Следовательно, анализ с использованием теплового шока был адаптировали и применяли для оценки стабильности мембраносвязанных полноразмерных белков. Вкратце, клетки HEK293T трансфицировали конструкциями на основе F-белка и использовали для анализа через 48 ч после трансфекции. Клетки отделяли от чашек для культуры клеток и клеточную суспензию подвергали тепловой обработке при возрастающих температурах в течение 10 мин. После тепловой обработки клетки окрашивали антителами к F RSV и анализировали с помощью проточной цитометрии. Данные по проточной цитометрии анализировали двумя разными способами. Анализировали процентную долю клеток, положительных по окрашиванию антителами к F, а также рассчитывали среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI) положительных клеток (фиг. 5).

Оба окрашивания с использованием CR9501 (антитела, распознающего только F-белок до слияния) и CR9503 (антитела, распознающего F-белок и до, и после слияния) использовали в анализах с проточной цитометрией. Антитело CR9503 служило в качестве положительного контроля. В том случае, когда F-белок утрачивает конформацию до слияния, но по-прежнему присутствует на поверхности клетки, белок все еще выявляют с использованием антитела CR9503. Утрата способности к окрашиванию обоими антителами свидетельствует о том, что белок отсутствует на поверхности клеток для связывания с антителом, например, из-за агрегации.

Полноразмерные белки с тремя или более аминокислотными заменами проверяли в анализе и сравнивали с F RSV дикого типа. Экспрессия данных вариантов была наивысшей, и, таким образом, данные варианты были предпочтительными кандидатами. Все белки содержали замены N67I и S215P, и при этом добавляли одну или две дополнительные стабилизирующие мутации.

Немодифицированный белок дикого типа белок характеризовался скорее стабильным окрашиванием антителом CR9503. MFI при окрашивании CR9503 повышалась при более высоких температурах, однако разброс значений также был очень высоким. Это свидетельствует о том, что после теплового шока агрегация белка отсутствовала. Половина конформации до слияния утрачивалась после инкубации клеток при примерно 55°C, после инкубации при 60°C утрачивались вся конформация до слияния, как было

продемонстрировано посредством снижения связывания CR9501 с образцами F дикого типа после теплового шока при возрастающих температурах.

Все протестированные варианты F-белка до слияния были более стабильными, чем F RSV дикого типа, при этом большая часть окрашивания с помощью CR9501 сохранялась также после обработки при более высоких температурах (фиг. 5 и 6). Белки с аминокислотной заменой K498R были менее стабильными, чем другие. Введение мутации K66E дополнительно стабилизировало белки, также как и варианты с аминокислотной заменой K498R становились такими же стабильными, как и другие, а утрату конформации до слияния при 60°C не отмечали. Только выбранные комбинации стабилизирующих мутаций тестировали с комбинацией K66E и I76V. Все четыре протестированных белка были стабильными, когда проанализировали процентную долю положительных клеток, однако при анализе MFI вариант с K498R показал четкое снижение связывания CR9501 после тепловой обработки при 60°C, что свидетельствует о том, что данный вариант является менее стабильным при оценке в анализе теплового стресса.

И в заключение, комбинацию из трех стабилизирующих мутаций (в том числе N67I и S215P) считали достаточной для высокого уровня экспрессии и стабильности. Мутации S46G или D486N выбрали в качестве третьей стабилизирующей мутации по причине их положения в структуре белка. Включали K66E и I76V, поскольку они не оказывали отрицательного воздействия на экспрессию белка и стабильность, но делали последовательность в большей степени подобной последовательности, встречающейся в природе.

Таким образом, F-белок RSV до слияния с мутациями K66E, N67I, I76V, S215P и D486N (F2.2) (SEQ ID NO: 2) и F-белок RSV до слияния с мутациями K66E, N67I, I76V, S215P и S46G (F2.1) (SEQ ID NO: 1) выбрали для конструирования аденовирусных векторов. Было показано, что данные белки являются стабильными в конформации до слияния в анализе термостабильности при температуре до 60°C и экспрессируются при высоких уровнях.

Пример 2. Получение аденовирусных векторов.

Клонирование гена F RSV в участок E1 Ad35 и Ad26.

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие F-белки до слияния по настоящему изобретению, подвергали генной оптимизации в отношении экспрессии у человека и синтезировали с помощью Geneart. Последовательность Козак (5' GCCACC 3') включали непосредственно перед стартовым кодоном ATG, а два стоп-кодона (5' TGA TAA 3') добавляли в конце кодирующей последовательности RSV.pre-F. Гены RSV.pre-F вставляли в плазмиду pAdApt35BSU и в плазмиду pAdApt26 по сайтам HindIII и XbaI.

Культура клеток.

Клетки PER.C6 (Fallaux et al., 1998, Hum Gene Ther 9: 1909-1917) поддерживали на среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM) с 10% фетальной бычьей сыворотки крови (FBS), дополненной 10 mM MgCl₂.

Получение аденовируса, инфицирование и пересев.

Все аденовирусы получали в клетках PER.C6® путем однократной гомологичной рекомбинации и выращивали, как описано ранее (для гAd35: Havenga et al., 2006, J. Gen. Virol. 87: 2135-2143; для гAd26: Abbink et al., 2007, J. Virol. 81: 4654-4663). Вкратце, клетки PER.C6 трансфицировали с помощью плазмид на основе Ad векторов с использованием липофектамина согласно инструкциям, предоставленным производителем (Life Technologies). Для "спасения", например, векторов Ad35, несущих кассету для экспрессии трансгенов RSV.pre-F, использовали плазмиду pAdApt35BSU.RSV.pre-F и космиду pWE/Ad35.pIX-rITR.dE3.5orf6, тогда как для векторов Ad26, несущих кассету для экспрессии трансгена RSV.pre-F, использовали плазмиду pAdApt26.RSV.pre-F и космиду pWE.Ad26.dE3.5orf6. Клетки собирали через один день после полного CPE, подвергали замораживанию-размораживанию, центрифугировали в течение 5 мин. при 3000 об./мин. и хранили при -20°C. Потом вирусы очищали с помощью метода бляшкообразования и амплифицировали в PER.C6, культивируемых в одной лунке 24-луночного планшета для культуры тканей. Дальнейшую амплификацию проводили в PER.C6, культивируемых с применением флакона для культуры тканей T25 и флакона для культуры тканей T175. Из флакона T175 с неочищенными лизатами, использовали 3-5 мл для инокуляции в 20×T175 трехслойных флаконов для культуры тканей, содержащих слои клеток PER.C6 с 70% конfluence. Вирус очищали с использованием способа двухэтапной очистки с использованием CsCl. В заключение вирус хранили в аликвотах при -85°C.

Пример 3. In vivo индуцирование иммунитета против F RSV с применением рекомбинантного аденовируса серотипов 26 и 35

Иммуногенность Ad26.RSV.preF2.1 и Ad26.RSV.preF2.2 оценивали на мышах, сравнивая клеточный и гуморальный иммунные ответы, индуцированные одинаковыми дозами Ad26.RSV.FA2 (т.е. экспрессирующих F-белок RSV дикого типа). Мышей Balb/c (n=4 на группу) иммунизировали с использованием указанных доз, составляющих от 10⁸ до 10¹⁰ вирусных частиц (vp) Ad26.RSV.FA2, или Ad26.RSV.preF2.1, или Ad26.RSV.preF2.2, или буфером для составления. Через 8 недель после примирования количество специфичных к RSV F A2 IFNγ-пятнообразующих единиц (ПОЕ) на 10⁶ спленоцитов

определяли с использованием ELISpot. Было показано, что Ad26.RSV.preF2.1 и Ad26.RSV.preF2.2 индуцировали повышение гуморального иммунного ответа у мышей по сравнению с Ad26.RSV.FA2 при явно выраженной нейтрализующей способности и сохраняющихся клеточных ответах. Однократная внутримышечная иммунизация с использованием Ad26.RSV.preF2.1 и Ad26.RSV.preF2.2 вызывала клеточный ответ (фиг. 7), который характеризовался индуцированием CD8⁺ Т-клеток, положительных по IFN γ , IL2 и/или TNF α (данные не показаны).

Количество и качество клеточных ответов было сопоставимым между Ad26.RSV.preF2.1, Ad26.RSV.preF2.2 и Ad26.RSV.FA2. В отличие от этого, Ad26.RSV.preF2.1 и Ad26.RSV.preF2.2 индуцировали существенно более высокие титры антител, нейтрализующих RSV, чем Ad26.RSV.FA2. Более детальный анализ ответов антител продемонстрировал, что Ad26.RSV.preF2.1 и Ad26.RSV.preF2.2 индуцировали более высокие уровни антител к F до слияния, тогда как титры антител к F после слияния оставались сопоставимыми с Ad26.RSV.FA2, результатом чего были значительно повышенные соотношения антител preF/postF. Кроме того, соотношение ответов антител IgG2a/IgG1 оставалось неизменным, демонстрируя аналогичное смещение к Th1 гуморального ответа, что было ранее продемонстрировано для Ad26.RSV.FA2 (фиг. 8).

Кроме того, по отношению к Ad26.RSV.preF2.2 было продемонстрировано, что образовавшиеся антитела были способны к нейтрализации разных штаммов RSV A и B, лабораторных штаммов, а также клинических изолятов, аналогично тому, что наблюдали в случае с Ad26.RSV.FA2 (фиг. 9).

Затем оценивали эффективность и иммуногенность векторных конструкций Ad26.RSV.preF2.2 и Ad35.RSV.preF2.2 в модели хлопкового хомяка. Эти животные являются чувствительными к репликации RSV человека с максимальными титрами RSV в легких в дни 4 и 5. Контрольные группы в экспериментах включали группы, которые интраназально инфицировали низкой дозой RSV A2, за счет чего имитировалось естественное заражение, а также группы, иммунизированные с применением FI-RSV, используя оригинальную партию 100, которая индуцировала усиленное респираторное заболевание (ERD) в клинических исследованиях в разведении, которое, как было показано, индуцирует ERD у хлопковых хомяков.

Результатом однократной внутримышечной иммунизации животных с помощью Ad26.RSV.preF2.2 в дозах, варьирующих от 10^5 до 10^8 vp/животное, или Ad35.RSV.preF2.2 в дозах, варьирующих от 10^6 до 10^9 vp/животное, была полная защита легких от инфекции вакцинным гомологичным штаммом RSV A2, за исключением 3 животных, иммунизированных с помощью 10^5 vp Ad26.RSV.preF2.2 (фиг. 10A и 10B). Дозозависимую защиту от репликации RSV в носовой полости отмечали для обоих векторов. Она варьировала от полной защиты при 10^8 vp/животное до частичной защиты при 10^5 vp в случае Ad26.RSV.preF2.2, тогда как для Ad35.RSV.preF2.2 носовые полости животных, иммунизированных 10^9 vp, были полностью защищены от RSV A2, при этом результатом 10^6 vp была частичная защита (фиг. 10C и 10D). Носовые полости животных, иммунизированных Ad26.RSV.preF2.2 и Ad35.RSV.preF2.2, были в лучшей степени защищены от инфекции RSV A2, чем при иммунизации их эквивалентами Ad26.RSV.FA2 и Ad35.RSV.FA2 F дикого типа при проведении анализа по дозам ($p=0,0003$ и $p=0,0001$). Защита от инфекции RSV сопровождалась дозозависимым индуцированием титров нейтрализующих вирус антител к RSV A Long, которые появлялись уже при применении наиболее низких доз Ad26.RSV.preF2.2 или Ad35.RSV.preF2.2 (фиг. 10E и 10F). Статистическое сравнение с учетом доз титров VNA к A Long показало, что Ad26.RSV.preF2.2 является более иммуногенным, чем Ad26.RSV.FA2 ($p=0,0414$), тогда как появление титров VNA значимо не отличалось между Ad35.RSV.preF2.2 и Ad35.RSV.FA2.

Дополнительно было продемонстрировано, что Ad26.RSV.preF и Ad35.RSV.preF не индуцируют появление гистопатологических признаков усиленного респираторного заболевания (ERD) после заражения RSV A2 при любых тестируемых концентрациях. Хлопковый хомяк является наиболее часто используемой и наиболее изученной моделью для наблюдения ERD. В данной модели животного вакцинация с помощью FI-RSV устойчиво индуцирует ERD после заражения с использованием RSV, что визуально наблюдается при гистопатологическом анализе срезов зараженных легких на предмет таких критериев, как альвеолит, состоящий главным образом из нейтрофильных инфильтратов, и перибронхиолит, состоящий главным образом из лимфоцитарных инфильтратов. У хлопковых хомяков оценку в баллах в отношении данных критериев при заболевании, индуцированном FI-RSV, можно проводить с 1 дня после инфицирования RSV с максимумом в 4-5 дни после заражения RSV.

ERD анализировали через 5 дней после заражения с использованием RSV A2 с помощью оценки в баллах по 4 критериям изменений при воспалении легких (перибронхиолит, периваскулит, интерстициальная пневмония, альвеолит). Иммунизация с использованием FI-RSV приводила к повышению баллов в отношении большинства гистопатологических маркеров, которые были особенно выражены в отношении альвеолита (фиг. 11), маркера, который, как было показано ранее, является наиболее специфическим для ERD. Повышение балла в отношении альвеолита или любого другого гистопатологического маркера для ERD не отмечали у животных, иммунизированных или Ad26.RSV.preF2.2, или Ad35.RSV.preF2.2 по схеме только с примирующим введением после заражения RSV, даже при низких дозах вакцины, которые могут индуцировать низкую аффинность/или низкие уровни антител (фиг. 11). Это подтверждает

предшествующие результаты авторов, полученные с векторами Ad26.RSV.FA2 и Ad35.RSV.FA2.

Таким образом, согласно настоящему изобретению было показано, что Ad26.RSV.preF и Ad35.RSV.preF являются высокоактивными аденовирусными векторами, экспрессирующими F RSV A2, который стабилизирован в конформации до слияния. Данные векторы индуцируют сильный гуморальный и клеточный иммунные ответы. Вызванный иммунный ответ является защитным против заражения RSV A2 и обеспечивает широкий диапазон *in vitro* нейтрализации вируса в отношении клинических и лабораторных изолятов RSV. Индуцирование ERD не выявляли у хлопковых хомяков после воздействия с помощью RSV на вакцинированных животных и, следовательно, это подтверждало данные, полученные для Ad26 и Ad35, кодирующих антиген RSV F A2 дикого типа. Ни у мышей, ни у хлопковых хомяков не проявились выраженные признаки реактогенности после инъекции либо Ad26.RSV.preF, либо Ad35.RSV.preF.

Таблица 1

**Аминокислотные последовательности F-белков RSV
до слияния, кодируемые молекулами нуклеиновой кислоты
по настоящему изобретению (мутации подчеркнуты)**

SEQ ID NO: 1: аминокислотная последовательность RSV
preF2.1:

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSVITI
ELSNIKEIKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAK
KTNVTLSKKRRRFLGFLGVSATASGVAVSKVLHLEGEVKNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSV
LTSKVLDLKNYIDKQLLPVKNQSCSIPNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYM
LTNSELLSLINDMPITNDQKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDHKGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVS
NKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIR
KSDELLHNVNAVKSTTNIMITTTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIA
FSN

SEQ ID NO: 2: аминокислотная последовательность RSV
preF2.2:

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITI
ELSNIKEIKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAK
KTNVTLSKKRRRFLGFLGVSATASGVAVSKVLHLEGEVKNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSV
LTSKVLDLKNYIDKQLLPVKNQSCSIPNIETVIEFQQKNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYM
LTNSELLSLINDMPITNDQKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWK
LHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDHKGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEV
NLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVS
NKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIR
KSDELLHNVNAVKSTTNIMITTTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIA
FSN

Таблица 2

**Нуклеотидная последовательность предпочтительных
молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению**

SEQ ID NO: 3: кодон-оптимизированная нуклеиновая кислота,
кодирующая белок RSV F pre-F2.1 до слияния

PreF2.1

ATGGAGCTGCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGCGTGACCTT
CTGCTTCGCCAGCGGCCAGAACATACCGAGGAGTTCTACCAGAGCACCTGCAGCGCCGTGAGC
AAGGGCTACCTGGGCGCCCTGAGAACCGGCTGGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGAGCA
ACATCAAGGAGATCAAGTGCAACGGCACCGACGCCAAGGTGAAGTGATCAAGCAGGAGCTGGA
CAAGTACAAGAACCGCGTGACCGAGCTGCAGCTGCTGATGCAGAGCACCCCGCCACCAACAAC
AGAGCCAGAAGAGAGCTGCCAGATTTCATGAATACACCCTGAACAACGCCAAGAAGACCAACG
TGACCCTGAGCAAGAAGAGAAAGAGAAGATTCTGGGCTTCCTGCTGGGCGTGGGCAGCGCCAT
CGCCAGCGGCGTGGCCGTGAGCAAGGTGCTGCACCTGGAGGGCGAGGTGAACAAGATCAAGAGC
GCCCTGCTGAGCACCAACAGGCCGTGGTGAGCCTGAGCAACGGCGTGAGCGTGTGACACGCA
AGGTGCTGGACCTGAAGAATACTACATCGACAAGCAGCTGCTGCCATCGTGAACAAGCAGAGCTG
CAGCATCCCCAACATCGAGACCGTGATCGAGTTCCAGCAGAAGAACAACAGACTGCTGGAGATC
ACCAGAGAGTTACGCGTGAACGCCGGCGTGACCACCCCGTGAGCACCTACATGCTGACCAACA
GCGAGCTGCTGAGCCTGATCAACGACATGCCCATCACCACGACCAGAAGAAGCTGATGAGCAA
CAACGTGCAGATCGTGAGACAGCAGAGCTACAGCATCATGAGCATCATCAAGGAGGAGGTGCTG
GCCTACGTGGTGACGTGCCCTGTACGGCGTGATCGACACCCCTGCTGGAAGCTGCACACCA
GCCCCCTGTGCACCACCAACACCAAGGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACCAGAACCAGCAGAGG
CTGGTACTGCGACAACGCCGGCAGCGTGAGCTTCTTCCCCAGGCCGAGACCTGCAAGGTGCAG
AGCAACAGAGTGTCTGCGACACCATGAACAGCCTGACCCTGCCAGCGAGGTGAACCTGTGCA
ACGTGGACATCTTCAACCCCAAGTACGACTGCAAGATCATGACCAGCAAGACCGACGTGAGCAG
CAGCGTGATCACCAGCCTGGGCGCCATCGTGAGCTGCTACGGCAAGACCAAGTGCACCGCCAGC
AACAAGAACAGAGGCATCATCAAGACCTTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGAGCAACAAGGGCG
TGGACACCGTGAGCGTGGGCAACACCTGTACTACGTGAACAAGCAGGAGGGCAAGAGCCTGTA
CGTGAAGGGCAGCCCATCATCAACTTCTACGACCCCTGGTGTTCGCCAGCAGAGTTCGAC
GCCAGCATCAGCCAGGTGAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCTTCATCAGAAAGAGCGACG
AGCTGCTGCACAACGTGAACGCCGTGAAGAGCACCAACATCATGATCACCACCATCATCAT
CGTGATCATCGTGATCCTGCTGAGCCTGATCGCCGTGGGCTGCTGCTGTACTGCAAGGCCAGA
AGCACCCCGTGACCTGAGCAAGGACCAGCTGAGCGGCATCAACAACATCGCCTTCAGCAACT
GA

SEQ ID NO: 4: кодон-оптимизированная нуклеиновая кислота,
кодирующая белок RSV F pre-F2.2 до слияния

PreF2.2

ATGGAGCTGCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGCGTGACCTT
CTGCTTCGCCAGCGGCCAGAACATACCGAGGAGTTCTACCAGAGCACCTGCAGCGCCGTGAGC
AAGGGCTACCTGAGCGCCCTGAGAACCGGCTGGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGAGCA
ACATCAAGGAGATCAAGTGCAACGGCACCGACGCCAAGGTGAAGTGATCAAGCAGGAGCTGGA
CAAGTACAAGAACCGCGTGACCGAGCTGCAGCTGCTGATGCAGAGCACCCCGCCACCAACAAC
AGAGCCAGAAGAGAGCTGCCAGATTTCATGAATACACCCTGAACAACGCCAAGAAGACCAACG
TGACCCTGAGCAAGAAGAGAAAGAGAAGATTCTGGGCTTCCTGCTGGGCGTGGGCAGCGCCAT
CGCCAGCGGCGTGGCCGTGAGCAAGGTGCTGCACCTGGAGGGCGAGGTGAACAAGATCAAGAGC
GCCCTGCTGAGCACCAACAGGCCGTGGTGAGCCTGAGCAACGGCGTGAGCGTGTGACACGCA
AGGTGCTGGACCTGAAGAATACTACATCGACAAGCAGCTGCTGCCATCGTGAACAAGCAGAGCTG
CAGCATCCCCAACATCGAGACCGTGATCGAGTTCCAGCAGAAGAACAACAGACTGCTGGAGATC
ACCAGAGAGTTACGCGTGAACGCCGGCGTGACCACCCCGTGAGCACCTACATGCTGACCAACA
GCGAGCTGCTGAGCCTGATCAACGACATGCCCATCACCACGACCAGAAGAAGCTGATGAGCAA
CAACGTGCAGATCGTGAGACAGCAGAGCTACAGCATCATGAGCATCATCAAGGAGGAGGTGCTG
GCCTACGTGGTGACGTGCCCTGTACGGCGTGATCGACACCCCTGCTGGAAGCTGCACACCA
GCCCCCTGTGCACCACCAACACCAAGGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACCAGAACCAGCAGAGG
CTGGTACTGCGACAACGCCGGCAGCGTGAGCTTCTTCCCCAGGCCGAGACCTGCAAGGTGCAG
AGCAACAGAGTGTCTGCGACACCATGAACAGCCTGACCCTGCCAGCGAGGTGAACCTGTGCA
ACGTGGACATCTTCAACCCCAAGTACGACTGCAAGATCATGACCAGCAAGACCGACGTGAGCAG
CAGCGTGATCACCAGCCTGGGCGCCATCGTGAGCTGCTACGGCAAGACCAAGTGCACCGCCAGC
AACAAGAACAGAGGCATCATCAAGACCTTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGAGCAACAAGGGCG
TGGACACCGTGAGCGTGGGCAACACCTGTACTACGTGAACAAGCAGGAGGGCAAGAGCCTGTA
CGTGAAGGGCAGCCCATCATCAACTTCTACGACCCCTGGTGTTCGCCAGCAACGAGTTCGAC
GCCAGCATCAGCCAGGTGAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCTTCATCAGAAAGAGCGACG
AGCTGCTGCACAACGTGAACGCCGTGAAGAGCACCAACATCATGATCACCACCATCATCAT
CGTGATCATCGTGATCCTGCTGAGCCTGATCGCCGTGGGCTGCTGCTGTACTGCAAGGCCAGA
AGCACCCCGTGACCTGAGCAAGGACCAGCTGAGCGGCATCAACAACATCGCCTTCAGCAACT
GA

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Crucell Holland B.V.

<120> Вакцина против RSV

<130> 0270 EP P00 PRI

<140> EP16163807

<141> 2015-04-05

<160> 4

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 574

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотная последовательность RSV preF2.1

<400> 1

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1. 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Gly Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Ile Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

043031

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Pro Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
370 375 380

043031

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Val Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
565 570

<210> 2

<211> 574

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> аминокислотная последовательность RSV preF2.2

<400> 2

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr

043031

1. 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Ile Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Pro Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu

043031

					245						250						255
Leu	Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Asp	Met	Pro	Ile	Thr	Asn	Asp	Gln	Lys	Lys		
			260					265					270				
Leu	Met	Ser	Asn	Asn	Val	Gln	Ile	Val	Arg	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Ile		
			275				280					285					
Met	Ser	Ile	Ile	Lys	Glu	Glu	Val	Leu	Ala	Tyr	Val	Val	Gln	Leu	Pro		
							295					300					
Leu	Tyr	Gly	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Cys	Trp	Lys	Leu	His	Thr	Ser	Pro		
305					310					315					320		
Leu	Cys	Thr	Thr	Asn	Thr	Lys	Glu	Gly	Ser	Asn	Ile	Cys	Leu	Thr	Arg		
					325					330					335		
Thr	Asp	Arg	Gly	Trp	Tyr	Cys	Asp	Asn	Ala	Gly	Ser	Val	Ser	Phe	Phe		
			340						345					350			
Pro	Gln	Ala	Glu	Thr	Cys	Lys	Val	Gln	Ser	Asn	Arg	Val	Phe	Cys	Asp		
			355					360					365				
Thr	Met	Asn	Ser	Leu	Thr	Leu	Pro	Ser	Glu	Val	Asn	Leu	Cys	Asn	Val		
							375					380					
Asp	Ile	Phe	Asn	Pro	Lys	Tyr	Asp	Cys	Lys	Ile	Met	Thr	Ser	Lys	Thr		
385					390					395					400		
Asp	Val	Ser	Ser	Ser	Val	Ile	Thr	Ser	Leu	Gly	Ala	Ile	Val	Ser	Cys		
					405					410					415		
Tyr	Gly	Lys	Thr	Lys	Cys	Thr	Ala	Ser	Asn	Lys	Asn	Arg	Gly	Ile	Ile		
				420					425					430			
Lys	Thr	Phe	Ser	Asn	Gly	Cys	Asp	Tyr	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Val	Asp		
			435					440					445				
Thr	Val	Ser	Val	Gly	Asn	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Val	Asn	Lys	Gln	Glu	Gly		
							455					460					
Lys	Ser	Leu	Tyr	Val	Lys	Gly	Glu	Pro	Ile	Ile	Asn	Phe	Tyr	Asp	Pro		
465					470					475					480		
Leu	Val	Phe	Pro	Ser	Asn	Glu	Phe	Asp	Ala	Ser	Ile	Ser	Gln	Val	Asn		

043031

485

490

495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Val Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
565 570

<210> 3

<211> 1725

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> кодон-оптимизированная нуклеиновая кислота, кодирующая белок RSV F pre-F2.1 до слияния

<400> 3

atggagctgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc
60

tgcttcgcca gcggccagaa catcaccgag gagttctacc agagcacctg cagcgccgtg
120

agcaagggct acctgggcgc cctgagaacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag
180

ctgagcaaca tcaaggagat caagtgaac ggcaccgacg ccaaggtgaa gctgatcaag
240

caggagctgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc
300

cccgccacca acaacagagc cagaagagag ctgcccagat tcatgaacta caccctgaac
360

aacgccaaaga agaccaacgt gaccctgagc aagaagagaa agagaagatt cctgggcttc
420

ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggcgtggccg tgagcaaggt gctgcacctg
480

gagggcgagg tgaacaagat caagagcgcc ctgctgagca ccaacaaggc cgtggtgagc
540

ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aaggtgctgg acctgaagaa ctacatcgac
600

aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tccccaacat cgagaccgtg
660

atcgagttcc agcagaagaa caacagactg ctggagatca ccagagagtt cagcgtgaac
720

gccggcgtga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgagcctg
780

atcaacgaca tgcccatcac caacgaccag aagaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc
840

gtgagacagc agagctacag catcatgagc atcatcaagg aggaggtgct ggcctacgtg
900

gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac acccctgct ggaagctgca caccagcccc
960

ctgtgcacca ccaacaccaa ggagggcagc aacatctgcc tgaccagaac cgacagaggc
1020

tgggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttcccc aggccgagac ctgcaagggtg
1080

cagagcaaca gagtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgcccag cgaggtgaac
1140

ctgtgcaacg tggacatctt caaccccaag tacgactgca agatcatgac cagcaagacc
1200

gacgtgagca gcagcgtgat caccagcctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc
1260

aagtgcaccg ccagcaacaa gaacagaggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac
1320

tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acaccctgta ctacgtgaac
1380

aagcaggagg gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc
1440

ctggtgttcc ccagcgacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtgaacga gaagatcaac
1500

cagagcctgg ccttcatcag aaagagcgac gagctgctgc acaacgtgaa cgccgtgaag
1560

agcaccacca acatcatgat caccaccatc atcatcgtga tcatcgtgat cctgctgagc
1620

ctgatcgccg tgggcctgct gctgtactgc aaggccagaa gcacccccgt gaccctgagc
1680

aaggaccagc tgagcggcat caacaacatc gccttcagca actga
1725

<210> 4
 <211> 1725
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> кодон-оптимизированная нуклеиновая кислота, кодирующая белок RSV
 F pre-F2.2 до слияния

<400> 4
 atggagctgc tgatcctgaa ggccaacgcc atcaccacca tcctgaccgc cgtgaccttc
 60
 tgcttcgcca gcggccagaa catcaccgag gagttctacc agagcacctg cagcgccgtg
 120
 agcaagggct acctgagcgc cctgagaacc ggctggtaca ccagcgtgat caccatcgag
 180
 ctgagcaaca tcaaggagat caagtgcaac ggcaccgacg ccaaggtgaa gctgatcaag
 240
 caggagctgg acaagtacaa gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc
 300
 cccgccacca acaacagagc cagaagagag ctgcccagat tcatgaacta caccctgaac
 360
 aacgccaaaga agaccaacgt gaccctgagc aagaagagaa agagaagatt cctgggcttc
 420
 ctgctgggcg tgggcagcgc catcgccagc ggctggccg tgagcaaggt gctgcacctg
 480
 gagggcgagg tgaacaagat caagagcgc ctgctgagca ccaacaaggc cgtggtgagc
 540
 ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgaccagc aaggtgctgg acctgaagaa ctacatcgac
 600
 aagcagctgc tgcccatcgt gaacaagcag agctgcagca tccccaacat cgagaccgtg
 660
 atcgagttcc agcagaagaa caacagactg ctggagatca ccagagagtt cagcgtgaac
 720
 gccggcgtga ccacccccgt gagcacctac atgctgacca acagcgagct gctgagcctg
 780
 atcaacgaca tgcccatcac caacgaccag aagaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc
 840
 gtgagacagc agagctacag catcatgagc atcatcaagg aggaggtgct ggcctacgtg
 900
 gtgcagctgc ccctgtacgg cgtgatcgac accccctgct ggaagctgca caccagcccc
 960
 ctgtgcacca ccaacaccaa ggagggcagc aacatctgcc tgaccagaac cgacagaggc

1020

tggtactgcg acaacgccgg cagcgtgagc ttcttcccc aggccgagac ctgcaagggtg
1080

cagagcaaca gagtgttctg cgacaccatg aacagcctga ccctgcccag cgagggtgaac
1140

ctgtgcaacg tggacatctt caaccccaag tacgactgca agatcatgac cagcaagacc
1200

gacgtgagca gcagcgtgat caccagcctg ggcgccatcg tgagctgcta cggcaagacc
1260

aagtgcaccg ccagcaacaa gaacagaggc atcatcaaga ccttcagcaa cggctgcgac
1320

tacgtgagca acaagggcgt ggacaccgtg agcgtgggca acaccctgta ctacgtgaac
1380

aagcaggagg gcaagagcct gtacgtgaag ggcgagccca tcatcaactt ctacgacccc
1440

ctggtgttcc ccagcaacga gttcgacgcc agcatcagcc aggtgaacga gaagatcaac
1500

cagagcctgg ccttcatacag aaagagcgc gagctgctgc acaacgtgaa cgccgtgaag
1560

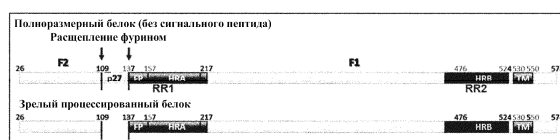
agcaccacca acatcatgat caccaccatc atcatcgtga tcatcgtgat cctgctgagc
1620

ctgategccg tgggcctgct gctgtactgc aaggccagaa gcacccccgt gaccctgagc
1680

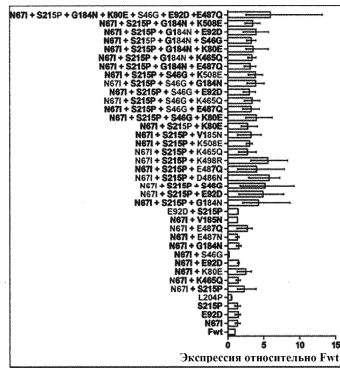
aaggaccagc tgagcggcat caacaacatc gccttcagca actga
1725

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

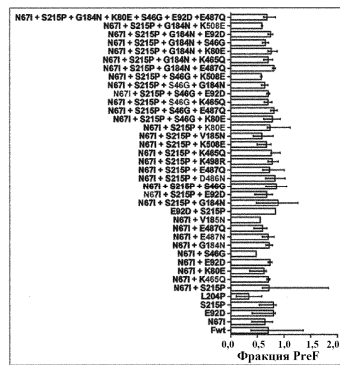
Способ вакцинации субъекта против RSV, при этом способ предусматривает введение субъекту вектора на основе рекомбинантного аденовируса человека серотипа 26, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую F-белок RSV, который стабилизирован в конформации до слияния (F-белок RSV до слияния), где F-белок RSV содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1 или 2, где рекомбинантный аденовирус человека имеет делецию в участке E1, делецию в участке E3 или делецию в обоих участках E1 и E3 аденовирусного генома.



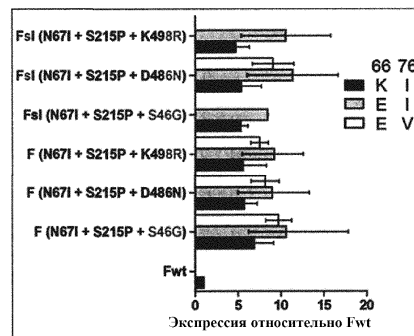
Фиг. 1



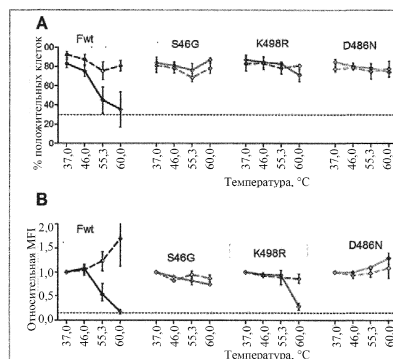
Фиг. 2



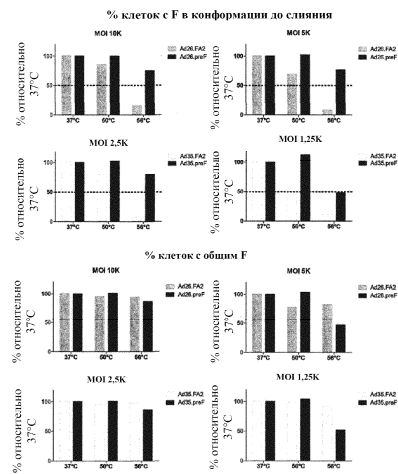
Фиг. 3



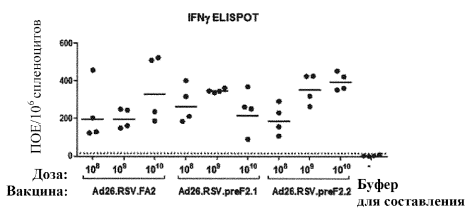
Фиг. 4



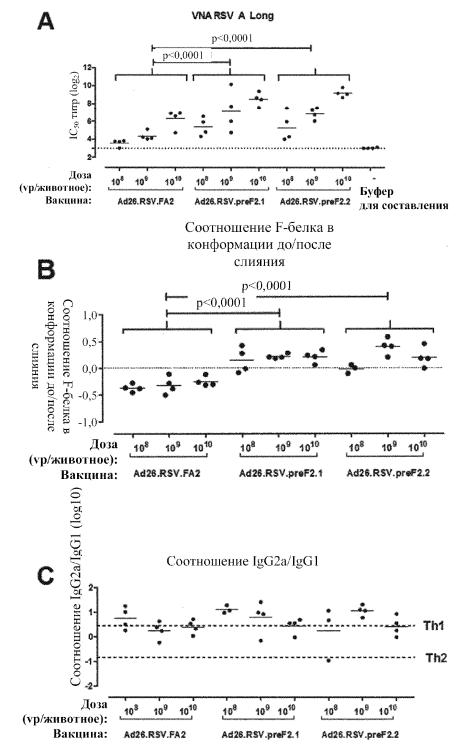
Фиг. 5



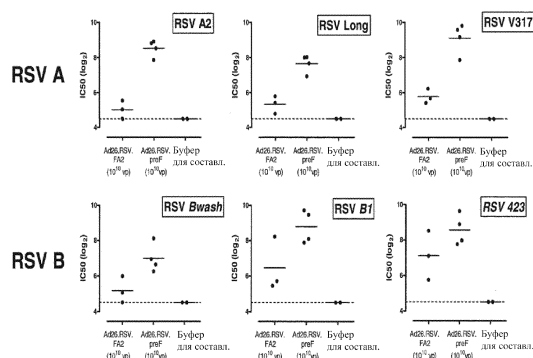
Фиг. 6



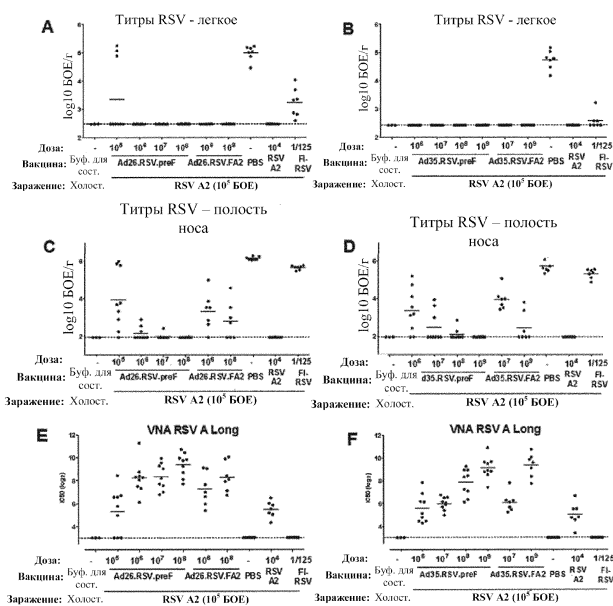
Фиг. 7



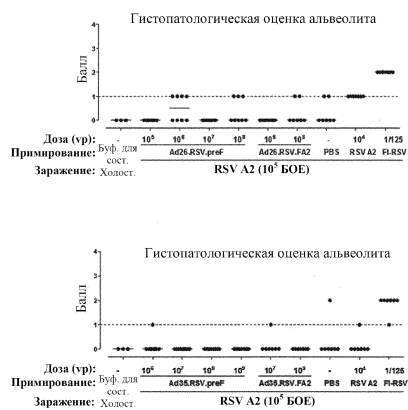
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11

