

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392322 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.14

(22) Дата подачи заявки
2022.02.18

(51) Int. Cl. A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/155 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
C07K 14/135 (2006.01)

(54) АНТИГЕНЫ К СТАБИЛИЗИРОВАННЫМ F-БЕЛКАМ ТИПА В РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА В КОНФОРМАЦИИ "ДО СЛИЯНИЯ"

(31) 63/151,262; 21165577.4
(32) 2021.02.19; 2021.03.29
(33) US; EP
(86) PCT/EP2022/054128
(87) WO 2022/175477 2022.08.25
(71) Заявитель:
ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Лангедейк Йоханнес Петрус Мария,
Ричель Тина, Баккерс Марк Йоханнес
Герардус (NL)
(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к стабильным F-белкам типа В (F_В-белкам) респираторно-синцициального вируса (РСВ) в конформации "до слияния", молекулам нуклеиновых кислот и векторам, кодирующим такие белки, к композициям, содержащим указанные белки, молекулы нуклеиновых кислот и/или векторы, а также к их применению для профилактики и/или лечения инфекции РСВ.

A1

202392322

202392322

A1

АНТИГЕНЫ К СТАБИЛИЗИРОВАННЫМ F-БЕЛКАМ ТИПА В РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА В КОНФОРМАЦИИ «ДО СЛИЯНИЯ»

5

Настоящее изобретение относится к области медицины. В частности, настоящее изобретение относится к рекомбинантным стабилизированным F-белкам типа В (F_В-белкам) респираторно-синцитиального вируса (РСВ) в конформации «до слияния» и их фрагментам и к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим F_В-белки РСВ и их фрагменты, а также к их применению, например в вакцинах.

10

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

После открытия респираторно-синцитиального вируса (РСВ) в 1950-х гг. этот вирус вскоре признали патогеном, связанным с инфекциями нижних и верхних дыхательных путей у людей. Подсчитано, что во всем мире ежегодно происходит 64 миллиона случаев инфицирования РСВ, что приводит к 160 000 смертей (по данным ВОЗ по острым респираторным инфекциям, сентябрь 2009 г.). Наиболее тяжелое течение заболевания встречается, в частности, у недоношенных детей, пожилых людей и лиц с ослабленным иммунитетом. У детей младше 2 лет РСВ является наиболее часто встречающимся патогеном респираторного тракта, на долю которого приходится около 50% госпитализаций в связи с респираторными инфекциями, при этом пик госпитализаций приходится на 2–4-месячный возраст. Сообщается, что к возрасту двух лет почти все дети переносят инфицирование РСВ. Повторное заражение в течение жизни связано с ослабленностью естественного иммунитета. У пожилых людей частота заболевания РСВ аналогична частоте заболеваний непандемическими инфекциями гриппа А.

15

20

25

РСВ представляет собой парамиксовирус, принадлежащий к подсемейству *Pneumoviridae*. Его геном кодирует различные белки, в том числе мембранные белки, известные как РСВ-гликопротеин (G) и РСВ-белок слияния (F-белок), которые являются основными антигенными мишенями для нейтрализующих антител. Антитела к F-белку могут предотвращать проникновение вируса в клетку и, таким образом, оказывать нейтрализующее действие.

30

F-белок РСВ сливает мембраны вируса и клетки-хозяина за счет необратимого рефолдинга белка из лабильной конформации «до слияния» в стабильную конформацию «после слияния». Структуры обеих конформаций были определены для F-белка РСВ (McLellan JS, *et al.* (2010, 2013, 2013); Swanson KA, *et al.* (2011)), как и для белков слияния из родственных парамиксовирусов, что обеспечивает понимание сложного механизма, воздействию которого подвергается этот белок слияния. Подобно другим белкам слияния класса I неактивный прекурсор, F₀ РСВ, требует расщепления фурин-подобной протеазой во время внутриклеточного созревания. F-белок РСВ содержит два сайта расщепления фурином, что приводит к образованию трех белков: F2, p27 и F1. Фрагмент p27 не является частью зрелого F-белка, а F2 и F1 связаны двумя дисульфидными мостиками, причем последний содержит гидрофобный пептид слияния (FP) на своем N-конце. Для обеспечения рефолдинга из конформации «до слияния» в конформацию «после слияния» область 1 рефолдинга (RR1) между остатками 137 и 216, которая включает FP и гептадный повтор A (HRA), должна трансформироваться из узла, состоящего из спиралей, петель и прядей, в длинную непрерывную спираль. После этого FP, расположенный на N-концевом сегменте RR1, способен отдаляться от мембраны вируса и встраиваться в проксимальную мембрану клетки-мишени. Затем область рефолдинга 2 (RR2), которая формирует C-концевой стержень в спайковом F-белке в конформации «до слияния» и включает в себя гептадный повтор B (HRB), перемещается на другую сторону головного домена F РСВ и связывает спиральную катушку тримера HRA с доменом HRB (гептадный повтор B) с образованием пучка из шести спиралей. Формирование спиральной катушки RR1 и перемещение RR2 для завершения шестиспирального пучка являются наиболее важными структурными изменениями, которые происходят в процессе рефолдинга.

В настоящее время еще нет вакцины, предотвращающей РСВ-инфекцию, но ее создание весьма востребовано из-за высокой частоты случаев данного заболевания. РСВ-гликопротеин слияния (F РСВ) представляет собой привлекательный антиген для такой вакцины, поскольку он является основной мишенью для нейтрализующих антител в сыворотке крови человека. Большинство нейтрализующих антител в сыворотке крови человека направлены к белку в конформации «до слияния», но из-за своей нестабильности конформация «до слияния» имеет склонность к преждевременному рефолдингу в конформацию «после слияния» как в растворе, так и на поверхности вирионов. Как указывалось выше, было обнаружено, что кристаллические структуры претерпевают значительное конформационное изменение

между состояниями «до слияния» и «после слияния». Степень изменения позволяет предположить, что только часть антител, направленных на F РСВ в конформации «после слияния», сможет перекрестно реагировать с нативной конформацией «до слияния» спайкового белка на поверхности вируса. Соответственно, усилия по

5 получению вакцины против РСВ сосредоточены на разработке вакцин, содержащих формы F-белка РСВ в конформации «до слияния» (см., например, WO2010/1149745, WO2010/1149743, WO2009/1079796, WO2012/158613). До сих пор эти усилия были сосредоточены на F-белках РСВ, полученных из штаммов РСВ А, при этом вакцины все еще не существует.

10 РСВ человека (РСВЧ) делится на два основных подтипа; РСВЧ А и РСВЧ В, которые различаются главным образом на основе отличий в последовательностях G-белка. Хотя F-белки штаммов А (F_A) и В (F_B) демонстрируют высокую степень идентичности последовательности (~ 95% в зрелом эктодомене), неизвестно, достаточна ли перекрестная реактивность F-антител.

15 Сохраняется потребность в эффективных вакцинах против РСВ. Настоящее изобретение направлено на создание средств для получения стабилизированных F_B-белков РСВ в конформации «до слияния» для их применения в вакцинах против РСВ.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным стабилизированным

20 белкам слияния (F-белкам) РСВ в конформации «до слияния», содержащим домены F1 и F2, содержащие аминокислотные последовательности доменов F1 и F2 F_B-белка РСВ штамма В (F_B-белки РСВ) и их фрагментов.

Изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим F_B-белки РСВ в конформации «до слияния» или их фрагменты, а также к вирусным

25 векторам, например аденовекторам, содержащим такие молекулы нуклеиновой кислоты.

Дополнительно настоящее изобретение относится к композициям, предпочтительно иммуногенным композициям или вакцинам, содержащим F_B-белок РСВ, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вирусный вектор, как описано в настоящем

30 документе, а также к их применению для индукции иммунного ответа к F-белку РСВ, в частности, к их применению в качестве вакцины против РСВ.

Изобретение также относится к способам индукции иммунного ответа к респираторно-синцитиальному вирусу (РСВ) у субъекта, включающим введение субъекту эффективного количества F_B-белка РСВ в конформации «до слияния», молекул нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный F_B-белок РСВ, и/или вектора, содержащего указанную молекулу нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе. Предпочтительно индуцированный иммунный ответ характеризуется индукцией выработки нейтрализующих антител и/или клеточного ответа к РСВ и/или защитного иммунитета к РСВ-инфекции.

Изобретение, в частности, обеспечивает способы вакцинации субъекта от РСВ, которые включают введение субъекту композиции или вакцины, как описано в настоящем документе.

Дополнительно изобретение обеспечивает способы предотвращения инфицирования и/или репликации РСВ у субъекта, которые включают введение субъекту композиции или вакцины, как описано в настоящем документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

ФИГ. 1. Схематическое изображение F-белка РСВ. F0 ферментативно процессируется в двух положениях в субъединицы F1 и F2 с помощью фурин-подобной протеазы, что приводит к высвобождению пептида p27 в зрелом процессированном белке. F1 и F2 соединены вместе дисульфидными связями (не показано).

ФИГ. 2. Анализ супернатанта клеточной культуры после трансфекции, проведенный с помощью биослойной интерферометрии. Показаны концентрации в супернатанте F РСВ и стабильность нестабилизированных и стабилизированных вариантов F, как описано в примере 2. Общее количество полипептида и количество конформации «до слияния» измеряли по связыванию CR9506 и CR9501 соответственно. Количество полипептида в конформации «после слияния» измеряли по связыванию ADI-15644 (Gilman et al., 2016). Нестабилизированный F-белок RSV181177 (SEQ ID NO: 3) сравнивали со стабилизированными вариантами в день сбора клеток и через 7 дней (A). Уровни экспрессии F РСВ в вариантах F_B РСВ с сигнальным пептидом РСВ типа A (RSV180816 и RSV180913) или РСВ типа B (RSV180910 и RSV180907), с С-меткой или без метки, в день сбора клеток (B). Уровни экспрессии F в конформации «до слияния» в вариантах F_B РСВ без метки с несколькими стабилизирующими аминокислотными

заменами: RSV180913 (I152M+K226M+D486N+S215P+L203I+P101Q, SEQ ID NO: 14) и дополнительной стабилизирующей мутацией D489Y (RSV190417; SEQ ID NO: 15), с аминокислотным остатком дикого типа в положении 226 (K226) (RSV190414, SEQ ID NO: 16) и с дрейфовыми мутациями L172Q+S173L (RSV190420; SEQ ID NO: 17) на день 0 и день 30 после сбора клеток (для оценки F-белка в конформации «после слияния» использовали положительный контроль из 20 мкг F-белка РСВ в конформации «после слияния», добавленных в супернатант имитационно трансфицированных клеток) (С). На Фиг. 2А и Б показаны средние значения и планки погрешностей при проведении двух независимых трансфекций. Данные на Фиг. 2В основаны на одной трансфекции.

ФИГ. 3. Профили эксклюзионной хроматографии размеров (SEC-профили) на последнем этапе очистки выбранных вариантов белка, как описано в примере 3. Величина собранной белковой фракции отображена между 2 вертикальными пунктирными линиями.

ФИГ. 4. Анализ ДСН-ПААГ. Данные вестерн-блоттинга по объединенным фракциям RSV180915 (SEQ ID NO: 6), RSV180916 (SEQ ID NO: 8) и RSV180917 (SEQ ID NO: 9) в невосстанавливающих и в восстанавливающих условиях (А). На В и С отображены данные, когда гели окрашивались красителем Кумасси. RSV190913 (SEQ ID NO: 14), образец белка с его хроматографическими пиками объединенной фракции с SEC-хроматограммы в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях (В). RSV190414 (SEQ ID NO: 16), RSV190420 (SEQ ID NO: 17) и RSV200125 (SEQ ID NO: 18), ДСН-ПААГ неочищенной фракции (1) и очищенного F-белка (2) в невосстанавливающих (правая панель) и восстанавливающих (левая панель) условиях (С).

ФИГ. 5. Аналитический SEC-анализ очищенных F-белков. Агрегаты и тримеры обозначены буквами А и Т соответственно. Белки оценивали с помощью ВЭЖХ или УВЭЖХ со временем удерживания тримера около 6,5 минуты или 4,5 минуты соответственно.

ФИГ. 6. Аналитический SEC-анализ очищенных F-белков РСВ типа В в конформации «до слияния» (n = 2) после хранения при 37 °С в течение 35 дней. Агрегаты и тримеры

обозначены буквами А и Т соответственно. Белки оценивали с помощью ВЭЖХ или УВЭЖХ со временем удерживания тримера около 6,5 минуты или 4,5 минуты соответственно.

5 ФИГ. 7. Криостабильность очищенных полипептидов типа В РСВ в конформации «до слияния» RSV180913 (SEQ ID NO: 14), RSV19420 (SEQ ID NO: 17) и RSV200125 (SEQ ID NO: 18). Процент остаточного тримера в конформации «до слияния», измеренный с помощью аналитического SEC-анализа после процесса медленного замораживания в различных буферах для приготовления состава. Содержание тримера в контрольном образце, хранившемся при 4 °C, принимали за 100%. Усредненные данные ±
10 стандартное отклонение.

ФИГ. 8. Данные по полноразмерным F-белкам РСВ-В, полученные с помощью FACS-анализа (цитометрии посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции). Транзиентная экспрессия полипептидов в клетках exрiHEK293F в течение 2 дней с последующим 10-минутным тепловым стрессом при 37 °C или 55 °C. Поверхностную
15 экспрессию F-белка в конформации «до слияния» измеряли с помощью моноклонального антитела CR9501, которое специфично к конформации «до слияния» F-белка РСВ.

ФИГ. 9. Иммуногенность F_В-белка в конформации «до слияния» RSV190420 (SEQ ID NO: 17) у мышей и хлопковых хомяков. F_В-белок РСВ в конформации «до слияния»
20 вводили в качестве внутримышечной иммунизации мышам и хлопковым хомякам на день 0 и день 28. Титры нейтрализующих вирус антител к штаммам РСВ определяли с помощью анализа на основе люциферазы светлячков (А), теста на уменьшение и нейтрализацию бляшкообразования (В) или анализа микронейтрализации (С) через 2 недели (мыши) или 3 недели (хлопковые хомяки) после последней иммунизации.
25 Символы представляют собой нейтрализующие титры для отдельных животных, тогда как средние титры обозначены горизонтальными линиями. Нижний предел обнаружения или ограничение обозначается пунктирной линией. FB: буфер для приготовления состава.

ФИГ. 10. Иммуногенность и защитная эффективность белка типа В в конформации «до слияния» RSV200125 (SEQ ID NO: 18) у хлопковых хомяков. Белок РСВ типа В в
30

конформации «до слияния» вводили в виде внутримышечной иммунизации хлопковым хомякам на день 0 и день 28, причем животных интраназально заражали на день 49 РСВ А2 или на день 50 РСВ В Wash. Вирусную нагрузку в легких и носовой полости определяли с помощью анализа бляшкообразования в гомогенатах тканей, выделенных
 5 через 5 дней после заражения (А). Образцы сыворотки крови, взятые перед провокационным заражением, анализировали на наличие нейтрализующих антител к штаммам РСВ с помощью анализа на основе люциферазы светлячков (В) или теста на уменьшение и нейтрализацию бляшкообразования (С). Символы показывают вирусную нагрузку или нейтрализующие титры для отдельных животных, тогда как средние
 10 титры показаны горизонтальными линиями. Нижний предел обнаружения или ограничение обозначается пунктирной линией. FB: буфер для приготовления состава.

ФИГ. 11. Иммуногенность Ad26, кодирующего процессированные или одноцепочечные варианты белка типа В в конформации «до слияния» (SEQ ID NO: 32 и 34) у мышей. Мышей иммунизировали различными дозами Ad26 процессированного или
 15 одноцепочечного белка РСВ типа В в конформации «до слияния» (Ad26.RSV.preF-B). Через 6 недель после иммунизации титры нейтрализующих вирус антител к указанным штаммам РСВ определяли с помощью анализа на основе люциферазы светлячков (А) или теста на уменьшение и нейтрализацию бляшкообразования (В). Клеточные иммунные ответы на F РСВ определяли в спленоцитах, выделенных через 6 недель
 20 после иммунизации, с помощью анализа IFN- γ ELISPOT. Символы представляют величину иммунных ответов отдельных животных, тогда как средние величины ответов обозначены горизонтальными линиями. Нижний предел обнаружения или ограничение обозначается пунктирной линией. FB: буфер для приготовления состава.

ФИГ. 12. Иммуногенность и защитная эффективность белков типа В в конформации
 25 «до слияния» RSV190414 (SEQ ID NO: 16), RSV190420 (SEQ ID NO: 17) и RSV200125 (SEQ ID NO: 18) у хлопковых хомяков. Белки РСВ типа В в конформации «до слияния» (50 мкг) вводили в качестве внутримышечной иммунизации хлопковым хомякам на день 0 и на день 28, а на день 49 животных интраназальным путем заражали РСВ B17-058221. Вирусную нагрузку в легких и носовой полости определяли с помощью
 30 анализа бляшкообразования в гомогенатах тканей, выделенных через 5 дней после заражения (А). Образцы сыворотки крови, взятые перед провокационным заражением, анализировали на наличие нейтрализующих антител к штаммам РСВ с помощью

анализа на основе люциферазы светлячков (В) или анализа микронеutralизации (С). Символы показывают вирусную нагрузку или нейтрализующие титры для отдельных животных, тогда как средние титры показаны горизонтальными линиями. Нижний предел обнаружения или ограничение обозначается пунктирной линией.

- 5 **ФИГ. 13.** Иммуногенность и защитная эффективность Ad26, кодирующего процессированный белок типа В в конформации «до слияния» (SEQ ID NO: 32 у хлопковых хомяков. Ad26.RSV-B.prgF вводили в качестве внутримышечной иммунизации хлопковым хомякам на день 0, при этом на день 49 животных интраназальным путем заражали РСВ А2 или РСВ В 17-058221. Вирусную нагрузку в
- 10 легких и носовой полости определяли с помощью анализа бляшкообразования в гомогенатах тканей, выделенных через 5 дней после заражения (А). Образцы сыворотки крови, взятые перед контрольным заражением, анализировали на наличие нейтрализующих антител к штаммам РСВ с помощью анализа микронеutralизации (В). Символы показывают вирусную нагрузку или нейтрализующие титры для
- 15 отдельных животных, тогда как средние титры показаны горизонтальными линиями. Нижний предел обнаружения или ограничение обозначается пунктирной линией.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

- РСВ человека (РСВЧ) является частым источником респираторных инфекций, вызывающих бронхит, пневмонию и хронические обструктивные заболевания легких у
- 20 людей всех возрастов. Белок слияния (F-белок) респираторно-синцитиального вируса (РСВ) участвует в слиянии вирусной мембраны с мембраной клетки-хозяина, что необходимо для инфицирования. мРНК F-белка РСВ транслируется в белок-предшественник из 574 аминокислот, обозначенный F0, который содержит последовательность сигнального пептида на N-конце (например, аминокислотные
- 25 остатки 1–25 из SEQ ID NO: 1), который удаляется сигнальной пептидазой в эндоплазматическом ретикулуле. F0 расщепляется по двум сайтам расщепления фурином (между аминокислотными остатками 109/110 и 136/137) клеточными протеазами (в частности, фуриновыми или фурин-подобными протеазами) с удалением короткой гликозилированной промежуточной последовательности (также называемой
- 30 областью p27, включающей аминокислотные остатки со 110 по 136, и образованием двух доменов (или субъединиц), обозначенных как F1 и F2 (Фиг. 1).

Домен F1 (аминокислотные остатки 137–574) содержит гидрофобный пептид слияния на своем N-конце, а C-конец содержит трансмембранную (ТМ) (аминокислотные остатки 530–550) и цитоплазматическую (аминокислотные остатки 551–574) области. Домен F2 (аминокислотные остатки 26–109) ковалентно связан с F1 двумя дисульфидными мостиками. Гетеродимеры F1–F2 формируются в вирионе в виде гомотримеров. В соответствии с настоящим изобретением термин «процессированный F-белок РСВ» обозначает F-белок РСВ после расщепления по сайтам расщепления фурином, т. е. без сигнального пептида и области p27.

Как описано выше, вакцины против РСВ-инфекции в настоящее время еще не существует. Одним из возможных подходов к производству вакцины является получение субъединичной вакцины на основе очищенного F-белка РСВ. Однако для использования этого подхода желательно, чтобы очищенный F-белок РСВ находился в конформации, которая похожа на конформацию F-белка РСВ «до слияния» и была бы стабильной во времени. Таким образом, усилия разработчиков были сосредоточены на F-белках РСВ, которые были стабилизированы в конформации «до слияния».

РСВ человека подразделяют на две основные антигенные группы штаммов: подтипы А и В, которые в значительной степени определяются генетической вариабельностью гликопротеина G. Эти подтипы демонстрируют нерегулярную различающуюся картину распространенности, причем подтип А имеет более высокий коэффициент кумулятивной заболеваемости, чем подтип В. F-белок высоко консервативен между РСВ А и В и индуцирует нейтрализующие антитела в двух группах. Однако, хотя F-белки штаммов А и В демонстрируют высокую степень идентичности последовательностей (~95% в зрелом эктодомене), неизвестно, достаточно ли широка перекрестная реактивность F-антител и может ли вакцина на основе F_A-белка РСВ защищать от заражения штаммами РСВ В.

Настоящее изобретение относится к новым стабилизированным рекомбинантным РСВ-белкам слияния (F-белкам) в конформации «до слияния», содержащим домены F1 и F2, которые содержат аминокислотные последовательности доменов F1 и F2 F-белка РСВ штамма В, причем аминокислотный остаток в положении 101 представляет собой Q, аминокислотный остаток в положении 152 представляет собой М, аминокислотный остаток в положении 215 представляет собой Р, а аминокислотный остаток в положении 486 представляет собой N. Таким образом, настоящее изобретение относится к стабилизированным рекомбинантным F-белкам РСВ подгруппы В (F_В РСВ) в конформации «до слияния» или их фрагментам. Позиции

позиции аминокислотных остатков соответствуют позициям аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 1. Согласно настоящему изобретению было продемонстрировано, что наличие определенных аминокислот в указанных положениях повышает стабильность белков в конформации «до слияния». Согласно настоящему изобретению определенные аминокислоты могут уже присутствовать в аминокислотной последовательности F_B-белка РСВ или могут быть введены путем замены (мутации) натурального аминокислотного остатка в этом положении на аминокислотный остаток, необходимый в данном положении согласно настоящему изобретению. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением белки могут содержать одну или более мутаций в своей аминокислотной последовательности по сравнению с аминокислотной последовательностью F_B-белка РСВ дикого типа.

В соответствии с настоящим изобретением термин «стабилизированный белок в конформации "до слияния"» обозначает белок, который стабилизирован в конформации «до слияния», т. е. который содержит по меньшей мере один эпитоп, специфичный для конформации «до слияния» F-белка РСВ, например, что определяется с помощью специфического связывания антитела, которое специфично в отношении определенных белков в конформации «до слияния» и может продуцироваться (экспрессироваться) в достаточных количествах.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток в положении 203 представляет собой I. В соответствии с настоящим изобретением было показано, что присутствие I в положении 203 дополнительно повышает стабильность F_B-белка РСВ, в особенности в растворимых F_B-белках РСВ.

Альтернативно, или дополнительно, аминокислотный остаток в положении 489 представляет собой Y. В соответствии с настоящим изобретением было показано, что полипептидная стабильность улучшается за счет наличия этого аминокислотного остатка в указанном положении.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток в положении 226 представляет собой M. Аминокислота M в положении 226 увеличивает стабильность и экспрессию белка.

В предпочтительном варианте осуществления аминокислотный остаток в положении 101 представляет собой Q, аминокислотный остаток в положении 152 представляет собой M, аминокислотный остаток в положении 203 представляет собой I, аминокислотный остаток в положении 215 представляет собой P, аминокислотный

остаток в положении 486 представляет собой N, а аминокислота в положении 357 не является R, и/или аминокислотный остаток в положении 371 не является Y.

В предпочтительном варианте осуществления аминокислотный остаток в положении 101 представляет собой Q, аминокислотный остаток в положении 152 представляет собой M, аминокислотный остаток в положении 203 представляет собой I, аминокислотный остаток в положении 215 представляет собой P, аминокислотный остаток в положении 486 представляет собой N, а аминокислотный остаток в положении 489 представляет собой Y.

В предпочтительном варианте осуществления аминокислотный остаток в положении 101 представляет собой Q, аминокислотный остаток в положении 152 представляет собой M, аминокислотный остаток в положении 203 представляет собой I, аминокислотный остаток в положении 215 представляет собой P, аминокислотный остаток в положении 486 представляет собой N, аминокислотный остаток в положении 489 представляет собой Y, а аминокислота в положении 357 не представляет собой R, и/или аминокислотный остаток в положении 371 не представляет собой Y.

В Chen et al. (Sci Rep. 8(1): 4491, 2018) отмечено появление дрейфовых мутаций L172Q и S173L в циркулирующих популяциях вируса в 2015–2016 гг. Кроме того, в Lu et al. (Sci Rep. 9(1): 3898, 2019) отмечено, что L172Q и S173L являются фиксированными и что K191R, I206M и Q209R возникли в штаммах 2015–2018 гг. Судя по последовательностям недавно циркулирующих штаммов (2018–2019 гг.), депонированным в ViPR и GISAID, очевидно, что все пять позиций теперь зафиксированы. Таким образом, в определенных вариантах осуществления аминокислотный остаток в положении 172 представляет собой Q, а аминокислотный остаток в положении 173 представляет собой L. Альтернативно, или дополнительно, аминокислотный остаток в положении 191 представляет собой R, аминокислотный остаток в положении 206 представляет собой M, а аминокислотный остаток в положении 209 представляет собой R. Таким образом, F_B-белки PCV обладают большим сходством с F-белком PCV циркулирующих штаммов PCV B.

В предпочтительном варианте осуществления аминокислотный остаток в положении 101 представляет собой Q, аминокислотный остаток в положении 152 представляет собой M, аминокислотный остаток в положении 172 представляет собой Q и аминокислотный остаток в положении 173 представляет собой L, аминокислотный остаток в положении 215 представляет собой P, аминокислотный остаток в положении 486 представляет собой N и аминокислотный остаток в положении 489

представляет собой Y, и необязательно аминокислотный остаток в положении 203 представляет собой I.

В другом предпочтительном варианте осуществления аминокислотный остаток в положении 101 представляет собой Q, аминокислотный остаток в положении 152 представляет собой M, аминокислотный остаток в положении 172 представляет собой Q и аминокислотный остаток в положении 173 представляет собой L, аминокислотный остаток в положении 191 представляет собой R, аминокислотный остаток в положении 206 представляет собой M и аминокислотный остаток в положении 209 представляет собой R, аминокислотный остаток в положении 215 представляет собой P, аминокислотный остаток в положении 486 представляет собой N, и необязательно аминокислотный остаток в положении 203 представляет собой I, и/или аминокислотный остаток в положении 489 представляет собой Y.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к рекомбинантным F-белкам в конформации «до слияния», как описано в настоящем документе, в которых аминокислотный остаток в положении 357 не является R, а аминокислотный остаток в положении 372 не является Y.

F_B-белки РСВ по настоящему изобретению могут содержать натуральные сайты расщепления фурином. В некоторых вариантах осуществления сайты расщепления фурином могут быть удалены. Удаление сайта расщепления фурином может включать делецию пептида p27. В этих вариантах осуществления F-белок будет оставаться «одноцепочечным» белком, т. е. не будет подвергаться процессингу фурином в формы F1 и F2. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления фурином был удален путем делеции пептида p27, включая делецию аминокислот 109—135, и замены делетированного пептида p27 линкером (или связывающей последовательностью, например GSGSG), связывающим домены F1 и F2, необязательно в комбинации с мутацией аминокислоты R в положении 106 в аминокислоту Q (R106Q) и аминокислоты F в положении 137 в аминокислоту S (F137S).

В некоторых вариантах осуществления белки содержат усеченный домен F1. Таким образом, для получения растворимого F_B-белка РСВ трансмембранная (ТМ) и цитоплазматическая области могут быть удалены с созданием растворимого секретируемого F-белка (sF-белка). Используемый в настоящем документе термин «усеченный» домен F1 обозначает домен F1, который не является полноразмерным доменом F1, т. е. в котором либо на N-конце, либо на C-конце удалены один или более

аминокислотных остатков. В соответствии с настоящим изобретением по меньшей мере трансмембранный домен и цитоплазматический хвост были удалены, чтобы сделать возможной экспрессию в виде растворимого эктодомена. В некоторых вариантах осуществления домен F1 был усечен после аминокислоты в положении 513, т. е. были удалены аминокислоты с 514 по 574.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный домен тримеризации был связан с С-концом усеченного домена F1, либо непосредственно, либо с помощью линкера (например, связывающей последовательности SAIG). Поскольку область ТМ отвечает за закоривание мембраны и повышает стабильность, безъякорный растворимый F-белок значительно более лабилен, чем полноразмерный белок, и, кроме того, будет более подвержен рефолдингу в конечную конформацию «после слияния». Таким образом, для получения стабилизированных растворимых F_В-белков в конформации «до слияния», которые показывают высокие уровни экспрессии, гетерологичный домен тримеризации может быть слит с С-концом усеченного домена F1 F_В-белка РСВ, либо непосредственно, либо с использованием линкера (например, связывающей последовательности SAIG). Например, для тримеризации растворимого F-белка РСВ домен тримеризации на основе фибритина может быть слит с С-концом эктодомена (McLellan et al., (2010, 2013)). Этот домен фибрина или «фолдон» получают из фибритина бактериофага Т4, и он был описан ранее как гетерологичный домен тримеризации (Letarov *et al.*, (1993); S-Guthe *et al.*, (2004)).

В предпочтительных вариантах осуществления гетерологичный домен тримеризации представляет собой домен фолдон, содержащий аминокислотную последовательность GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL (SEQ ID NO: 2).

В некоторых вариантах осуществления белки содержат сигнальный пептид F_А-белка РСВ для улучшения экспрессии растворимого белка. Специалисту в данной области будет понятно, что процессированные F_В-белки РСВ не содержат сигнального пептида.

Следует понимать, что в соответствии с настоящим изобретением нумерация положений аминокислотных остатков также соответствует нумерации аминокислот в SEQ ID NO: 1.

Согласно настоящему изобретению присутствие определенных стабилизирующих аминокислот в указанных положениях повышает стабильность белков в конформации «до слияния». Согласно настоящему изобретению определенные аминокислоты могут либо уже присутствовать в аминокислотной последовательности,

либо могут быть введены путем замены (мутации) аминокислоты в этом положении на конкретную аминокислоту согласно настоящему изобретению.

Таким образом, настоящее изобретение относится к новым рекомбинантным стабилизированным F_B-белкам РСВ в конформации «до слияния», т. е. к F_B-белкам РСВ, которые стабилизированы в конформации «до слияния», и/или к их фрагментам. По настоящему изобретению стабильные F-белки РСВ в конформации «до слияния» или их фрагменты находятся в конформации «до слияния», т. е. они содержат (демонстрируют) по меньшей мере один эпитоп, специфичный для F-белка в конформации «до слияния». Эпитоп, специфичный для F-белка в конформации «до слияния», представляет собой эпитоп, который не присутствует в конформации «после слияния». Без стремления к ограничению какой-либо конкретной теорией считается, что конформация F_B-белка РСВ «до слияния» содержит эпитопы, которые являются такими же, как на F_B-белках РСВ, с экспрессией на природных РСВ-вирионах, и, следовательно, она может иметь преимущества при получении нейтрализующих антител с необходимыми защитными свойствами.

В некоторых вариантах осуществления F_B-белки РСВ в конформации «до слияния» по настоящему изобретению или их фрагменты содержат по меньшей мере один эпитоп, который распознается моноклональным антителом, специфичным к белку в конформации «до слияния», например, CR9501. CR9501 содержит переменные области тяжелой и легкой цепей и, следовательно, обладает специфичностью связывания антитела 58C5, которое, как ранее было показано, является моноклональным антителом, специфичным для конформации «до слияния», т. е. антителом, связывающим F-белок РСВ в конформации «до слияния», а не в конформации «после слияния» (см. WO 2012/006596).

Как было указано выше, фрагменты F-белка РСВ в конформации «до слияния» также охватываются настоящим изобретением. Фрагмент может быть образован в результате либо amino-концевой (например, путем отщепления сигнальной последовательности), либо карбокси-концевой (например, путем удаления трансмембранной области и/или цитоплазматического хвоста) делеции, либо в результате обеих этих делеций. Фрагмент может быть выбран так, чтобы он содержал иммунологически активный фрагмент F-белка, т. е. ту часть, которая вызывает иммунный ответ у субъекта. Это можно легко определить с использованием методов *in silico*, *in vitro* и/или *in vivo*, которые являются обычными для специалиста в данной области. Таким образом, термин «фрагмент», используемый в настоящем документе,

относится к белку, который имеет аминоконцевую и/или карбоксиконцевую и/или промежуточную делецию, но в котором оставшаяся аминокислотная последовательность идентична в соответствующих положениях в последовательности F_B-белка РСВ, например полноразмерной последовательности F_B-белка РСВ. Следует
 5 понимать, что для индуцирования иммунного ответа и в целом для целей вакцинации белок не обязательно должен быть полноразмерным или иметь все функции дикого полноразмерного типа, а фрагменты белка (т. е. без сигнального пептида) одинаково полезны.

В определенных вариантах осуществления кодируемые белки или их фрагменты
 10 по настоящему изобретению содержат сигнальную последовательность, также называемую лидерной последовательностью или сигнальным пептидом, соответствующую аминокислотам 1–25 SEQ ID NO: 1. Сигнальные последовательности обычно представляют собой короткие (например, длиной 5–30 аминокислот) аминокислотные последовательности, присутствующие на N-конце большинства вновь
 15 синтезированных белков, предназначенных для секреторного пути, и обычно расщепляются сигнальной пептидазой с образованием свободного сигнального пептида и зрелого белка.

Сигнальная последовательность может быть сигнальной последовательностью F_A-белка РСВ или F_B-белка РСВ. В определенных вариантах осуществления белки или
 20 их фрагменты по настоящему изобретению не содержат сигнальной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии F_B-белков РСВ в конформации «до слияния» по настоящему изобретению повышен по сравнению с нестабилизированным F_B-белком РСВ дикого типа (т. е. без стабилизирующих
 25 аминокислот).

В некоторых вариантах осуществления содержание фракции белков в конформации «до слияния» (определяемой как фракция F_B-белка, который связывается с антителом CR9501, специфичным для белковой конформации «до слияния») значительно выше через 7 дней после сбора белков после хранения при 4 °C по
 30 сравнению с фракцией F_B-белка без указанных стабилизирующих замен. В некоторых вариантах осуществления содержание фракции белков в конформации «до слияния» было значительно выше через 30 дней после сбора белков после хранения при 4 °C по сравнению с фракцией F_B-белка без указанных стабилизирующих замен. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления очищенные F_B-белки РСВ в

конформации «до слияния» согласно настоящему изобретению обладают повышенной стабильностью при хранении при 4 °С по сравнению с F_B-белками РСВ без стабилизирующих аминокислотных остатков в определенных положениях. Под «стабильностью при хранении» подразумевается, что белки после определенного промежутка времени все еще демонстрируют по меньшей мере один эпитоп, специфичный для антитела, специфичного для белковой конформации «до слияния» (например, CR9501), при хранении белка в растворе (например, в культуральной среде) при 4 °С. В определенных вариантах осуществления белки демонстрируют по меньшей мере один эпитоп, специфичный для конформации «до слияния», в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев, предпочтительно в течение по меньшей мере 1 года при хранении F-белков РСВ в конформации «до слияния» при 4 °С.

F_B-белки РСВ в конформации «до слияния» в соответствии с настоящим изобретением стабилизируются в конформации «до слияния» за счет присутствия одной или более стабилизирующих аминокислот (либо уже присутствующих, либо полученных в результате мутаций), т. е. они не могут легко измениться в конформацию «после слияния» при обработке белков, такой как, например, очистка, циклы замораживания-оттаивания и/или хранение и т. д.

В определенных вариантах осуществления очищенные F-белки РСВ в конформации «до слияния» согласно настоящему изобретению обладают повышенной стабильностью при хранении при 37 °С по сравнению с F-белками РСВ без стабилизирующих аминокислотных остатков в определенных положениях.

В определенных вариантах осуществления F_B-белки РСВ в конформации «до слияния» согласно настоящему изобретению обладают повышенной термостабильностью, что определяется измерением температуры плавления, как описано в примере 4, по сравнению с F-белками РСВ с другими (например, дикого типа) аминокислотными остатками в определенных положениях.

В определенных вариантах осуществления в белках обнаруживают более высокое содержание тримеров после замораживания-оттаивания в соответствующих буферах для приготовления состава по сравнению с F-белками РСВ с другими аминокислотными остатками (например, дикого типа) в определенных положениях.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления F_B-белки РСВ содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 16, 17, 18, 29, 30, 32 и 34. Следует понимать, что после экспрессии и обработки белки больше не будут содержать сигнальный пептид и пептид p27. Таким

образом, в определенных предпочтительных вариантах осуществления F_B-белок РСВ содержит аминокислотную последовательность, содержащую домен F2, содержащий аминокислоты 26–109 из SEQ ID NO: 14, и домен F1, содержащий аминокислоты 137–513 из SEQ ID NO: 14; домен F2, содержащий аминокислоты 26–109 из SEQ ID NO: 16, и домен F1, содержащий аминокислоты 137–513 из SEQ ID NO: 16; домен F2, содержащий аминокислоты 26–109 из SEQ ID NO: 17, и домен F1, содержащий аминокислоты 137–513 из SEQ ID NO: 17; домен F2, содержащий аминокислоты 26–109 из SEQ ID NO: 18, и домен F1, содержащий аминокислоты 137–513 из SEQ ID NO: 18; или домен F2, содержащий аминокислоты 26–109 из SEQ ID NO: 29, и домен F1, содержащий аминокислоты 137–574 из SEQ ID NO: 29, или домен F2, содержащий аминокислоты 26–109 из SEQ ID NO: 32, и домен F1, содержащий аминокислоты 137–574 из SEQ ID NO: 32. Отмечено, что белок с SEQ ID NO: 30 и 34 не будет подвергаться модификации и останется одноцепочечным белком, содержащим аминокислоты 26–574 из SEQ ID NO: 30 или 34.

В некоторых вариантах осуществления белки содержат HIS-метку, стрептококковую метку или с-метку. Белковая His-метка или полигистидиновая метка представляет собой аминокислотный мотив в белках, состоящий по меньшей мере из пяти остатков гистидина (H); стрептококковая метка представляет собой аминокислотную последовательность, состоящую из 8 остатков (WSHPQFEK (SEQ ID NO: 27)); с-метка представляет собой аминокислотный мотив, состоящий из 4 остатков (EPEA; SEQ ID NO: 28). Метки часто находятся на N- или C-конце белка и обычно используются для целей очистки.

Как описано выше, известно, что РСВ существует в виде одного серотипа, имеющего две антигенные подгруппы: А и В. Аминокислотные последовательности эктодоменов зрелых процессированных F-белков двух групп идентичны на около 95%. В настоящей заявке положения аминокислот даны согласно консенсусной последовательности F-белка клинических изолятов подгруппы В (SEQ ID NO: 1). Таким образом, используемая в настоящем изобретении формулировка «аминокислотный остаток в положении x» в F-белке РСВ означает аминокислоту, соответствующую аминокислоте в положении x F-белка РСВ из SEQ ID NO: 1. Следует отметить, что в системе нумерации, используемой в данной заявке, цифра 1 относится к N-концевой аминокислоте из консенсусной последовательности незрелого F0-белка (SEQ ID NO: 1). Когда используется F-белок другого РСВ-штамма В, положения аминокислот в белке F должны быть пронумерованы в соответствии с нумерацией F-

белка с SEQ ID NO: 1 путем выравнивания последовательностей другого РСВ-штамма В с консенсусной последовательностью F-белка с SEQ ID NO: 1 с вставкой гэпов по мере необходимости. Выравнивание последовательностей можно проводить с использованием способов, хорошо известных в данной области, например, с помощью компьютерных программ CLUSTALW, Bioedit или CLC Workbench.

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

Аминокислота согласно настоящему изобретению может представлять собой любую из двадцати встречающихся в природе (или «стандартных») аминокислот. Стандартные аминокислоты можно разделить на несколько групп в зависимости от их свойств. Важными факторами являются заряд, гидрофильность или гидрофобность, размер и функциональные группы. Эти свойства важны для структуры белка и белок-белковых взаимодействий. Некоторые аминокислоты обладают особыми свойствами, например, цистеин, который может формировать ковалентные дисульфидные связи (или дисульфидные мостики) с другими остатками цистеина, пролин, который индуцирует повороты белкового остова, и глицин, структура которого является более гибкой, чем у других аминокислот. В таблице 1 показаны аббревиатуры и свойства стандартных аминокислот.

Специалисту в данной области будет понятно, что добавление мутаций в белок может быть выполнено с помощью обычных процедур молекулярной биологии. Мутации согласно настоящему изобретению предпочтительно приводят к повышенным уровням экспрессии и/или повышенной стабилизации F_B-белков РСВ в конформации «до слияния» по сравнению с F_B-белками РСВ, которые не содержат этих мутаций.

Настоящее изобретение дополнительно относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим F_B-белки РСВ согласно этому изобретению. Термин «молекула нуклеиновой кислоты», используемый в настоящем изобретении, относится к полимерной форме нуклеотидов (т. е. полинуклеотидам) и включает как ДНК (например, кДНК, геномную ДНК), так и РНК, а также синтетические формы и смешанные полимеры вышеперечисленных молекул. Следует понимать, что многочисленные различные молекулы нуклеиновых кислот могут кодировать один и тот же белок в результате вырожденности генетического кода. Кроме того, понятно, что специалисты в данной области могут, используя стандартные методики, производить замены нуклеотидов, которые не влияют на последовательность белка с

кодированием описанными там полинуклеотидами, чтобы показать особенности использования кодонов любым конкретным организмом-хозяином, в котором должны экспрессироваться белки. Следовательно, если не указано иное, термин «молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность» включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности, кодирующие белки и РНК, могут включать в себя интроны. Нуклеотидные последовательности в настоящем документе представлены в направлении от 5' к 3', как принято в данной области.

В предпочтительных вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие белки по настоящему изобретению, являются кодон-оптимизированными для экспрессии в клетках млекопитающих, предпочтительно в клетках человека или клетках насекомых. Способы оптимизации кодонов известны и были описаны ранее (например, WO 96/09378 для клеток млекопитающих). Последовательность считается кодон-оптимизированной, если по меньшей мере один не являющийся предпочтительным кодон по сравнению с последовательностью дикого типа заменен более предпочтительным кодоном. В настоящем документе не являющийся предпочтительным кодон представляет собой кодон, который используется в организме реже, чем другой кодон, кодирующий ту же аминокислоту, а более предпочтительным кодоном является кодон, который используется в организме чаще, чем не являющийся предпочтительным кодон. Частоту использования кодонов для конкретного организма можно найти в таблицах частот кодонов, например на сайте <http://www.kazusa.or.jp/codon>. Предпочтительно более одного не являющегося предпочтительным кодона, предпочтительно большинство или все не являющиеся предпочтительными кодоны заменяют более предпочтительными кодонами. Предпочтительно наиболее часто используемые кодоны в организме используют в кодон-оптимизированной последовательности. Замена предпочтительными кодонами по существу приводит к более высоким уровням экспрессии.

Последовательности нуклеиновых кислот могут быть клонированы с использованием обычных методов молекулярной биологии или могут быть созданы *de novo* путем синтеза ДНК, который может быть выполнен с использованием стандартных процедур в компаниях, занимающихся вопросами синтеза ДНК и/или молекулярного клонирования (например, GeneArt, GenScripts, Invitrogen, Eurofins).

В определенных предпочтительных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты кодируют F_B-белки РСВ, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 16, 17, 18, 29, 30, 32 и 34.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты содержат последовательность нуклеотидов, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31 и 33.

Настоящее изобретение также относится к векторам, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, как описано выше. Таким образом, в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению является частью вектора. Такими векторами можно легко манипулировать с помощью способов, хорошо известных специалистам в данной области, а также, например, их можно сконструировать так, чтобы они были способны к репликации в прокариотических и/или эукариотических клетках. Используемый вектор может быть любым вектором, приемлемым для клонирования ДНК и который можно использовать для экспрессии интересующей молекулы нуклеиновой кислоты. Приемлемыми векторами согласно настоящему изобретению являются, например, аденовекторы, альфавирус, парамиксовирус, вирус осповакцины, вирус герпеса, ретровирусные векторы и т. п.

В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой аденовирусный вектор. Аденовирус по настоящему изобретению принадлежит к семейству Adenoviridae и предпочтительно относится к роду Mastadenovirus. Это может быть аденовирус человека, а также аденовирус, инфицирующий другие виды, включая, без ограничений, аденовирус крупного рогатого скота (например, аденовирус крупного рогатого скота 3, BAdV3), собачий аденовирус (например, CAdV2), свиной аденовирус (например, PAdV3 или 5) или обезьяний аденовирус (который включает в себя аденовирус нечеловекоподобных обезьян и аденовирус человекоподобных обезьян, такой как аденовирус шимпанзе или аденовирус гориллы). Предпочтительно аденовирус представляет собой аденовирус человека (HAdV или AdHu) или обезьяний аденовирус, такой как аденовирус шимпанзе или гориллы (ChAd, AdCh или SAdV), или аденовирус макаки-резуса (RhAd). В настоящем изобретении под аденовирусом подразумевают аденовирус человека, если он обозначается как Ad без указания вида, т. е. краткое обозначение Ad26 означает то же, что и HAdV26, который представляет собой аденовирус человека серотипа 26. Кроме того, в настоящем документе обозначение rAd означает рекомбинантный аденовирус, например, rAd26 относится к рекомбинантному аденовирусу человека 26.

Наиболее передовые исследования проводили с использованием человеческих аденовирусов человека, и аденовирусы человека являются предпочтительными относительно некоторых аспектов изобретения. В определенных предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус по изобретению основан на аденовирусе человека. В предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус основан на аденовирусе человека серотипов 5, 11, 26, 34, 35, 48, 49, 50, 52 и т. п. Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26. Преимущества этих серотипов включают в себя низкую серопревалентность и/или низкие титры предсуществующих нейтрализующих антител в человеческой популяции, а также опыт применения на людях в клинических испытаниях.

Обезьяньи аденовирусы по существу также имеют низкую серопревалентность и/или низкие титры предсуществующих нейтрализующих антител в человеческой популяции; также сообщалось о значительном количестве работ с использованием аденовирусных векторов шимпанзе (например, US6083716; WO 2005/071093; WO 2010/086189; WO 2010085984; Farina et al, 2001, J Virol 75: 11603-13; Cohen et al, 2002, J Gen Virol 83: 151-55; Kobinger et al, 2006, Virology 346: 394-401; Tatsis et al., 2007, Molecular Therapy 15: 608-17; см. также обзор Bangari and Mittal, 2006, Vaccine 24: 849-62; и обзор Lasaro and Ertl, 2009, Mol Ther 17: 1333-39). Таким образом, в других вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус по настоящему изобретению основан на обезьяньем аденовирусе, т. е. аденовирусе шимпанзе. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус основан на обезьяньем аденовирусе типов 1, 7, 8, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27.1, 28.1, 29, 30, 31.1, 32, 33, 34, 35.1, 36, 37.2, 39, 40.1, 41.1, 42.1, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50 или SA7P. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус основан на аденовирусе шимпанзе, таком как ChAdOx 1 (см., например, WO 2012/172277) или ChAdOx 2 (см., например, WO 2018/215766). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус основан на аденовирусе шимпанзе, таком как BZ28 (см., например, WO 2019/086466). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус основан на аденовирусе гориллы, таком как BLY6 (см., например, WO 2019/086456) или BZ1 (см., например, WO 2019/086466).

В предпочтительном варианте осуществления аденовирусные векторы содержат капсидные белки редких серотипов, включая, например, Ad26. В типичном варианте осуществления вектор представляет собой вирус rAd26. Термин «аденовирусный

капсидный белок» обозначает белок на капсиде аденовируса (например, векторов Ad26, Ad35, rAd48, rAd5HVR48), который играет роль в определении серотипа и/или тропизма конкретного аденовируса. Аденовирусные капсидные белки обычно включают в себя фибриллярные белки, пентон-белки и/или гексон-белки.

- 5 Используемый в настоящем документе термин «капсидный белок» для конкретного аденовируса, например «капсидный белок Ad26», может обозначать, например, химерный капсидный белок, который включает в себя по меньшей мере часть капсидного белка Ad26. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок представляет собой целый капсидный белок Ad26. В некоторых вариантах
- 10 осуществления гексон, пентон и фибриллярный белок представляют собой белки Ad26.

- Специалисту в данной области будет понятно, что элементы, полученные из множества серотипов, могут быть объединены в один рекомбинантный аденовирусный вектор. Таким образом, можно получить химерный аденовирус, который сочетает в себе требуемые свойства различных серотипов. Таким образом, в некоторых вариантах
- 15 осуществления химерный аденовирус по настоящему изобретению может сочетать в себе отсутствие предсуществующего иммунитета первого серотипа с такими характеристиками, как температурная стабильность, особенности сборки, заякоривание, скорость размножения, перенаправленное или улучшенное заражение, стабильность ДНК в клетке-мишени и т. п. См., например, WO 2006/040330 для
- 20 химерного аденовируса Ad5HVR48, который включает в себя остов Ad5 и часть капсидов от Ad48, а также, например, WO 2019/086461 для химерных аденовирусов Ad26HVRPtr1, Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13, которые включают в себя остов вируса Ad26 и частично капсидные белки: Ptr1, Ptr12 и Ptr13 соответственно)

- В определенных предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный
- 25 аденовирусный вектор, используемый для целей настоящего изобретения, получают в основном или полностью из Ad26 (т. е. вектор представляет собой rAd26). В некоторых вариантах осуществления аденовирус является дефицитным по репликации, например, потому что он содержит делецию в области E1 генома. Для аденовирусов, полученных из аденовирусов, не входящих в группу C, таких как Ad26 или Ad35, типичной является
- 30 замена последовательности, кодирующей аденовирусный белок E4-orf6, на последовательность, кодирующую E4-orf6 аденовируса человека подгруппы C, например Ad5. Это позволяет размножать такие аденовирусы в хорошо известных комплементирующих клеточных линиях, которые экспрессируют гены E1 аденовируса Ad5, например, клетки 293, клетки PER.C6 и т. п. (см., например, Havenga, et al., 2006, J

Gen Virol 87: 2135-43; WO 03/104467). Однако такие аденовирусы не будут способны к репликации в некомплементирующих клетках, которые не экспрессируют гены E1 аденовируса Ad5.

Получение рекомбинантных аденовирусных векторов хорошо известно в данной области. Получение векторов гAd26 описано, например, в WO 2007/104792 и в Abbink et al., (2007) Virol 81(9): 4654-63. Примеры последовательностей генома Ad26 находятся в GenBank Accession EF 153474 и в SEQ ID NO: 1 WO 2007/104792. Примеры векторов, используемых для целей настоящего изобретения, включают, например, векторы, описанные в патенте WO 2012/082918, описание полностью включено в настоящем документе путем ссылки.

Как правило, вектор, используемый для целей настоящего изобретения, получают с использованием нуклеиновой кислоты, содержащей весь рекомбинантный аденовирусный геном (например, плазмидный, космидный или бакуловирусный вектор). Таким образом, настоящее изобретение также относится к выделенным молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют аденовирусные векторы по настоящему изобретению. Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, полученные путем клонирования или синтетическим путем, могут быть в форме РНК или в форме ДНК. ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной.

Аденовирусные векторы, используемые для целей настоящего изобретения, обычно дефицитны по репликации. В этих вариантах осуществления вирус становится дефицитным по репликации путем делеции или инактивации областей, критически важных для репликации вируса, таких как область E1. Эти области могут быть существенным образом удалены или инактивированы, например, путем вставки в данную область целевого гена, такого как ген, кодирующий определенный F-белок РСВ (обычно связанный с промотором), или ген, кодирующий какой-либо F-белок РСВ (обычно связанный с промотором). В некоторых вариантах осуществления векторы по настоящему изобретению могут содержать делеции в других областях, таких как области E2, E3 или E4, или вставки гетерологичных генов, связанных с промотором в пределах одной или более из этих областей. Для E2- и/или E4-мутантных аденовирусов по существу используют E2- и/или E4-комплементирующие клеточные линии для создания рекомбинантных аденовирусов. Мутации в области E3 аденовируса не обязательно должны быть комплементированы клеточной линией, поскольку E3 не требуется для репликации.

Упаковывающая клеточная линия обычно используется для получения достаточного количества аденовирусных векторов для применения в настоящем изобретении. Упаковывающая клетка представляет собой клетку, которая содержит те гены, которые были удалены или инактивированы в векторе с дефицитом репликации, что позволяет вирусу реплицироваться в клетке. Приемлемые упаковочные клеточные линии для аденовирусов с делецией в области E1 включают, например, PER.C6, 911, 293 и E1 A549.

В предпочтительном варианте осуществления вектор представляет собой аденовирусный вектор, а более предпочтительно — вектор rAd26, наиболее предпочтительно — вектор rAd26 с делецией по меньшей мере в области E1 аденовирусного генома, например, как описано в работе Abbink, J Virol, 2007. 81(9): с. 4654-63, которая включена в настоящий документ путем ссылки. Как правило, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую F-белок РСВ, клонируют в область E1 и/или E3 аденовирусного генома.

Клетки-хозяева, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие F_B-белки РСВ в конформации «до слияния», также составляют часть изобретения. F-белки РСВ в конформации «до слияния» могут быть получены с помощью технологии рекомбинантной ДНК, включающей экспрессию молекул в клетках-хозяевах, например, в клетках яичника китайского хомячка (СНО), в линии опухолевых клеток, в ВНК-клетках, в линиях человеческих клеток, такие как клетки НЕК293, клетки PER.C6, или в дрожжевых клетках, клетках грибов, клетках насекомых и т. п., или в клетках трансгенных животных или растений. В определенных вариантах осуществления клетки получают из многоклеточного организма, в определенных вариантах осуществления их получают от позвоночных или беспозвоночных. В определенных вариантах осуществления клетки представляют собой клетки млекопитающих. В определенных вариантах осуществления клетки представляют собой клетки человека. Как правило, получение в клетке-хозяине рекомбинантных белков, таких как F-белки РСВ в конформации «до слияния» по изобретению, включает введение в клетку-хозяина молекулы гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей F-белок РСВ в экспрессируемом формате, культивирование клеток в условиях, способствующих экспрессии данной молекулы нуклеиновой кислоты и обеспечивающих экспрессию белка в указанной клетке. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая F-белок РСВ в экспрессируемом формате, может быть в форме кассеты экспрессии, и обычно требуется наличие последовательностей, способных вызывать экспрессию нуклеиновой

кислоты, таких как последовательности энхансера (-ов), промотора, сигнала к началу полиаденилирования и т. п. Специалисту в данной области известно, что для достижения экспрессии гена в клетках-хозяевах можно использовать различные промоторы. Промоторы могут быть конститутивными или регулируемыми и могут
 5 быть получены из различных источников, включая вирусы, прокариотические или эукариотические источники, или они могут быть искусственно сконструированы.

Среды для культивирования клеток доступны от различных поставщиков, и для клетки-хозяина можно обычно выбирать приемлемую среду для экспрессии интересующих белков, в данном случае F-белков РСВ в конформации «до слияния».

10 Приемлемая среда может содержать или не содержать сыворотку.

«Гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты» (также называемая в настоящем документе «трансгеном») представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая в природных условиях не присутствует в клетке-хозяине. Ее вводят, например, в вектор стандартными методами молекулярной биологии. Трансген обычно
 15 функционально связан с последовательностями, обеспечивающими контроль экспрессии. Например, это можно обеспечить, поместив нуклеиновую кислоту, кодирующую трансген (-ы), под контроль промотора. Можно добавить дополнительные регуляторные последовательности. Многие промоторы, известные специалистам в данной области, могут быть использованы для экспрессии трансгена (-ов), например, они могут включать вирусные промоторы, промоторы млекопитающих, синтетические промоторы и т. п. Не имеющим ограничительного характера примером промотора, приемлемого для обеспечения экспрессии в эукариотических клетках, является CMV-промотор (патент США 5,385,839), например, предранний промотор CMV, содержащий, например, nt (нуклеотиды) от -735 до +95 из энхансера/промотора
 20 гена, кодирующего предранний CMV. Сигнал к началу полиаденилирования (polyA), например сигнал polyA бычьего гормона роста (патент США 5,122,458), может располагаться за трансгеном (-ами). Альтернативно в данной области доступны в продаже несколько широко используемых векторов экспрессии, например серии векторов pcDNA и pEF от Invitrogen, pMSCV и pTK-Hyg от BD Sciences, pCMV-Script от Stratagene и т. д., которые можно использовать для рекомбинантной экспрессии
 25 интересующего белка или для получения приемлемых последовательностей промоторов и/или терминаторов транскрипции, polyA-последовательностей и т. п.

Клеточная культура может представлять собой культуру клеток любого типа, включая культуру адгерентных клеток, например клеток, прикрепленных к

поверхности культурального сосуда или к микроносителям, а также суспензионную культуру. Большинство крупномасштабных суспензионных культур культивируются в качестве периодической (batch) или полупериодической (fed-batch) культуры, так как они являются самыми простыми в эксплуатации и масштабировании. В настоящее время непрерывные процессы, основанные на принципах перфузии, становятся все более распространенными и также приемлемыми для культивирования. Приемлемые культуральные среды также хорошо известны специалистам в данной области и обычно могут быть получены из коммерческих источников в больших количествах или изготовлены на заказ в соответствии со стандартными протоколами. Культивирование можно проводить, например, в чашках, роллерных бутылках или в биореакторах с использованием периодической (batch), полупериодической (fed-batch), непрерывной систем культивирования и т. п. Приемлемые условия для культивирования клеток известны (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)).

Изобретение дополнительно относится к композициям, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, белок, его фрагмент и/или вектор по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям, содержащим F-белок РСВ в конформации «до слияния», который содержит эпитоп, характерный для F-белка РСВ в конформации «до слияния», но отсутствующий в конформации «после слияния», и/или фрагмент этого белка.

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты и/или вектор, кодирующие такой F_B-белок РСВ в конформации «до слияния» и/или его вектор. В предпочтительном варианте осуществления композиции содержат F_B-белок РСВ и/или его фрагмент, а также вектор по настоящему изобретению для их одновременного введения. Для введения композиций людям согласно настоящему изобретению можно использовать фармацевтические композиции, содержащие нуклеиновую кислоту, белок и/или вектор, а также фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В настоящем контексте термин «фармацевтически приемлемый» означает, что носитель или эксципиент в применяемых дозах и концентрациях не будет вызывать каких-либо нежелательных или вредных эффектов у субъектов, которым их вводят. Такие фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты хорошо известны в данной области (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]). Очищенную нуклеиновую кислоту, белок и/или вектор предпочтительно добавляют в композицию и вводят в виде стерильного раствора, хотя также можно использовать

5 лиофилизированные препараты. Стерильные растворы готовят посредством стерилизующей фильтрации или другими способами, по существу известными в данной области. Затем растворы лиофилизируют или разливают в фармацевтические дозировочные контейнеры. pH раствора обычно находится в диапазоне от 3,0 до 9,5,

10 предпочтительно в диапазоне от 5,0 до 7,5. Нуклеиновая кислота, белок и/или вектор обычно находятся в растворе, содержащем приемлемый фармацевтически приемлемый буфер; и раствор может также содержать соль. Необязательно может присутствовать стабилизирующий агент, такой как альбумин. В определенных вариантах осуществления добавляют детергент. В некоторых вариантах осуществления

15 нуклеиновая кислота, белок и/или вектор могут быть включены в состав препарата для инъекций. Эти составы включают в себя эффективные количества нуклеиновой кислоты, белка и/или вектора, представляют собой стерильные жидкие растворы, жидкие суспензии или лиофилизированные версии и необязательно содержат стабилизаторы или эксципиенты.

20 Например, аденовирус может храниться в буферном растворе, который также предусмотрен в Мировом стандарте по аденовирусу (Hoganson et al, Development of a stable adenoviral vector formulation, Bioprocessing March 2002, p. 43-48): 20 mM Трис pH 8, 25 mM NaCl, 2,5% глицерина. Другой используемый буфер для приготовления состава, приемлемый для введения людям, включает в себя 20 mM Tris, 2 mM MgCl₂, 25

25 mM NaCl, 10% (масс./об.) сахарозы, 0,02% (масс./об.) полисорбата-80. Очевидно, что можно использовать ряд других буферных растворов, и несколько примеров составов, приемлемых для хранения и введения фармацевтических препаратов на основе очищенного (адено)вируса, можно найти, например, в Европейском патенте № 0853660, патенте США 6,225,289 и в международных патентных заявках WO 99/41416,

30 WO 99/12568, WO 00/29024, WO 01/66137, WO 03/049763, WO 03/078592, WO 03/061708.

В определенных вариантах осуществления композиции дополнительно содержат один или более адьювантов. В данной области известно, что адьюванты дополнительно усиливают иммунный ответ на используемую антигенную детерминанту; такие

фармацевтические композиции, содержащие аденовирус и приемлемые адъюванты, описаны, например, в патентной заявке WO 2007/110409, включенной в настоящий документ путем ссылки. Термины «адъювант» и «иммуностимулятор» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и обозначают одно или более веществ,

5 вызывающих стимуляцию иммунной системы. В данном контексте адъювант используют для усиления иммунного ответа на аденовирусные векторы по настоящему изобретению. Примеры приемлемых адъювантов включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия; композиции на основе масляной эмульсии (или композиции масло-в-воде), включая эмульсии сквален-вода, такие как

10 MF59 (см., например, WO 90/14837); сапониновые составы, такие как, например, QS21 и иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS) (см., например, патент США 5,057,540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); бактериальные или микробные производные, примерами которых являются монофосфорилипид А (MPL), 3-О-деацилированный MPL (3dMPL), олигонуклеотиды,

15 содержащие CpG-мотив, АДФ-рибозилирующие бактериальные токсины или их мутанты, такие как термолабильный энтеротоксин E. coli LT, холерный токсин ХТ и т. п. Можно также использовать адъювант, кодируемый вектором, например, путем использования гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая кодирует слияние домена олигомеризации С4-связывающего белка (С4bp) с интересующим антигеном

20 (например, Solabomi et al, 2008, Infect Immun 76: 3817-23). В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат алюминий в качестве адъюванта, например, в виде гидроксида алюминия, фосфата алюминия, фосфата алюминия-калия или их комбинации в концентрациях 0,05–5 мг, например от 0,075–1,0 мг алюминия на одну дозу.

25 В других вариантах осуществления композиции не содержат адъювантов.

Дополнительно настоящее изобретение относится к вакцине против РСВ, содержащей композицию, как описано в настоящем документе.

Настоящее изобретение также относится к применению стабилизированного F_B-белка РСВ в конформации «до слияния», его фрагмента, молекулы нуклеиновой

30 кислоты и/или вектора согласно настоящему изобретению для индукции у субъекта иммунного ответа к F-белку РСВ.

Кроме того, предложены способы индукции у субъекта иммунного ответа к F-белку РСВ, в частности F_B РСВ, включающие введение субъекту F_B-белка РСВ в конформации «до слияния», и/или молекулы нуклеиновой кислоты, и/или вектора

согласно настоящему изобретению. Кроме того, предложены V_F -белки РСВ в конформации «до слияния», молекулы нуклеиновых кислот и/или векторы согласно настоящему изобретению для применения в обеспечении индукции у субъекта иммунного ответа к F -белку РСВ, в частности F_V -белку РСВ. Кроме того, предложено применение F_V -белков РСВ в конформации «до слияния», и/или молекул нуклеиновых кислот, и/или векторов согласно настоящему изобретению для изготовления лекарственного средства для применения в обеспечении индукции у субъекта иммунного ответа к F -белку РСВ, в частности F_V -белку РСВ.

Кроме того, предложены способы вакцинации субъекта от РСВ, в частности от штамма В РСВ, причем данный способ включает введение субъекту композиции или вакцины, как описано в настоящем документе.

Кроме того, изобретение обеспечивает способы предотвращения инфицирования и/или репликации РСВ, в частности штамма В РСВ, у субъекта, которые включают введение субъекту композиции или вакцины, как описано в настоящем документе.

F_V -белки РСВ в конформации «до слияния», фрагменты, молекулы нуклеиновых кислот или векторы по изобретению можно использовать для предотвращения (профилактики) и/или лечения инфекций РСВ, в частности инфекций РСВ, вызванных штаммом В РСВ. В определенных вариантах осуществления профилактика и/или лечение могут быть нацелены на группы пациентов, которые восприимчивы к инфекции РСВ. Такие группы пациентов включают, без ограничений, пожилых людей (например, ≥ 50 лет, ≥ 60 лет и предпочтительно ≥ 65 лет), детей (например, ≤ 5 лет, ≤ 1 года), беременных женщин (при материнской иммунизации), госпитализированных пациентов и пациентов, которых лечили противовирусным лекарственным соединением, но был показан неадекватный противовирусный ответ.

F_V -белки РСВ в конформации «до слияния», фрагменты, молекулы нуклеиновых кислот и/или векторы по настоящему изобретению можно использовать, например, в качестве самостоятельной терапии и/или профилактики заболевания или состояния, вызванного РСВ, или в комбинации с другими профилактическими и/или терапевтическими методами лечения, такими как (существующие или будущие) вакцины, противовирусные агенты и/или моноклональные антитела.

Дополнительно настоящее изобретение относится к способам профилактики и/или лечения инфекции РСВ, в частности инфекции РСВ, вызванной штаммом В РСВ, у нуждающегося в этом субъекта с использованием F_V -белков РСВ в конформации «до

слияния», фрагментов, молекул нуклеиновых кислот и/или векторов согласно настоящему изобретению.

В конкретном варианте осуществления указанные способы профилактики и/или лечения инфекции РСВ, в частности инфекции РСВ, вызванной штаммом В РСВ, у субъекта включают введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества F_B-белка РСВ в конформации «до слияния», фрагмента, молекулы нуклеиновой кислоты и/или вектора, как описано в настоящем документе. Термин «терапевтически эффективное количество» обозначает количество белка, молекулы нуклеиновой кислоты или вектора, эффективное для профилактики, облегчения и/или лечения заболевания или состояния, возникающего в результате заражения РСВ. Профилактика включает ингибирование или уменьшение распространения РСВ, или ингибирование или уменьшение случаев возникновения, развития или прогрессирования одного или более симптомов, связанных с заражением РСВ. Термин «облегчение», используемый в настоящем документе, может относиться к уменьшению видимых или ощутимых симптомов заболевания, виремии или любого другого измеримого проявления инфекции гриппа.

В определенных вариантах осуществления указанные способы приводят к предотвращению подтвержденного полимеразной цепной реакцией с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) РСВ-опосредованного заболевания нижних дыхательных путей (LRTD). В определенных вариантах осуществления указанные способы приводят к уменьшению проявления подтвержденного полимеразной цепной реакцией с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) РСВ-опосредованного заболевания нижних дыхательных путей (LRTD), по сравнению с субъектами, которым не вводили комбинацию вакцины.

Кроме того, или альтернативно, указанные способы характеризуются отсутствием или снижением вирусной нагрузки РСВ в носовых ходах и/или в легких субъекта при воздействии РСВ.

Кроме того, или альтернативно, указанные способы характеризуются отсутствием или ослаблением выраженности клинического симптома РСВ у субъекта при воздействии РСВ.

Кроме того, или альтернативно, указанные способы характеризуются наличием нейтрализующих антител к РСВ и/или защитного иммунитета к РСВ, в частности штамму В РСВ.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления способы имеют приемлемый профиль безопасности.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам изготовления вакцины против респираторно-синцитиального вируса (РСВ), в частности против РСВ В, включающим получение F_В-белка РСВ, его фрагмента, нуклеиновой кислоты или вектора в соответствии с настоящим изобретением и получение его в виде фармацевтически приемлемой композиции.

Согласно настоящему изобретению термин «вакцина» обозначает агент или композицию, содержащих активный компонент, эффективный для индукции определенной степени иммунитета у субъекта к определенному патогену или заболеванию, что приведет по меньшей мере к снижению (вплоть до полного отсутствия) тяжести, продолжительности или иного проявления симптомов, связанных с заражением возбудителем или определенным заболеванием. В настоящем изобретении вакцина содержит эффективное количество F_В-белка РСВ в конформации «до слияния», фрагмента, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей F_В-белок РСВ в конформации «до слияния», и/или вектора, содержащего указанную молекулу нуклеиновой кислоты, что приводит к возникновению иммунного ответа к F-белку РСВ. Это обеспечивает способ предотвращения серьезного заболевания нижних дыхательных путей, ведущего к госпитализации, и снижения частоты осложнений, таких как пневмония и бронхиолит, из-за инфекции РСВ и репликации вируса у субъекта. Термин «вакцина» согласно настоящему изобретению обозначает фармацевтическую композицию и, таким образом, обычно включает в себя фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или эксципиент. Она может содержать или не содержать дополнительные активные ингредиенты. В некоторых вариантах осуществления это может быть комбинированная вакцина, которая дополнительно содержит другие компоненты, вызывающие иммунный ответ, например к другим белкам РСВ и/или к другим инфекционным агентам. Введение дополнительных активных компонентов может осуществляться, например путем отдельного введения или путем введения комбинации основных ингредиентов вакцин по настоящему изобретению и дополнительных активных компонентов.

Композиции можно вводить субъекту, например человеку. Общая дозировка F_В-белков РСВ в композиции для однократного введения может составлять, например, от около 0,01 мкг до около 10 мг, например от 1 мкг до 1 мг, например от 10 мкг до 100 мкг. Общая дозировка (адено)векторов, содержащих ДНК, кодирующую F-белки РСВ,

в композиции для однократного введения может составлять, например, около $0,1 \times 10^{10}$ вирусных частиц (ВЧ)/мл и 2×10^{11} , предпочтительно от около 1×10^{10} ВЧ/мл до 2×10^{11} ВЧ/мл, предпочтительно от 5×10^{10} ВЧ/мл до 1×10^{11} ВЧ/мл.

Введение композиций согласно настоящему изобретению можно осуществлять с использованием стандартных путей введения. Не имеющие ограничительного характера варианты осуществления включают парентеральное введение, такое как внутридермальное, внутримышечное, подкожное, чрескожное введение или введение через слизистую оболочку, например интраназальное, оральное и т. п. В одном варианте осуществления композицию вводят путем внутримышечной инъекции.

Специалисту в данной области известны различные возможности введения композиции, например в виде вакцины для индукции иммунного ответа на присутствующий (-ие) в вакцине антиген (-ы).

Термин «субъект», используемый в настоящем документе, предпочтительно представляет собой млекопитающее, например грызуна, т. е. мышь, хлопкового хомяка, или нечеловекообразного примата или человека. Предпочтительно субъект представляет собой человека.

Белки, молекулы нуклеиновых кислот, векторы и/или композиции также можно вводить либо в качестве прайм-вакцины, либо в виде бустерной, при гомологичной или гетерологичной вакцинации в режиме прайм-буст. Если проводят бустерную вакцинацию, как правило, такую бустерную вакцину вводят тому же субъекту в период времени от одной недели до одного года, предпочтительно от двух недель до четырех месяцев, после первого введения композиции субъекту (в таких случаях подразумевается «прайм-вакцина»). В некоторых вариантах осуществления введение включает введение прайм-вакцины и по меньшей мере одной бустерной вакцины.

Кроме того, белки по настоящему изобретению можно использовать в качестве диагностического средства, например для тестирования иммунного статуса индивидуума путем проверки наличия в сыворотке крови такого индивидуума антител, способных связываться с белком по настоящему изобретению. Таким образом, настоящее изобретение также относится к диагностическому способу *in vitro* для обнаружения наличия у пациента инфекции РСВ причем указанный способ включает стадии: а) приведения биологического образца, полученного от указанного пациента, в контакт с белком по настоящему изобретению; и б) обнаружения наличия комплексов антитело-белок.

Примеры

Пример 1. *Конфигурация растворимого тримерного белка путем введения С-концевого фолдона и стабилизирующих точечных мутаций*

Было получено несколько вариантов F-белка PCB в конформации «до слияния».

- 5 Растворимые кандидаты усечены в положении аминокислоты 513 в домене F1 PCB В и слиты с помощью четырехаминокислотного линкера (SAIG) с доменом тримеризации фибритина (фолдоном) (GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL; SEQ ID NO: 2). Сигнальный пептид PCB штамма В (SEQ ID NO: 24) или сигнальный пептид PCB штамма А (SEQ ID NO: 23) белка слияния использовали для обеспечения экспрессии
- 10 данных белков. В некоторых конструкциях были обеспечены линкер и С-метка на С-конце, связанном с последовательностью фолдона, что позволяло проводить аффинную очистку (например, SEQ ID NO: 3).

Для стабилизации белков в конформации «до слияния» использовали несколько комбинаций точечных мутаций, например одну или более мутаций P101Q, I152M,

15 K226M, D486N, S215P, L203I и/или D489Y.

Пример 2. *Экспрессия и стабильность вариантов F_В-белков PCB после транзientной трансфекции в клетках HEK293F*

Нестабилизированный F_В-белок PCB, используемый в качестве контроля при оценке экспрессии и стабильности (SEQ ID NO: 3), был основан на усеченной

20 консенсусной последовательности для подгруппы В (SEQ ID NO: 1) и содержит эктодомен F_В-белка PCB SEQ ID NO: 1, содержащий связь С-конца через линкер с фолдоновым доменом (SEQ ID NO: 2), а также N-концевой сигнальный пептид на основе F-белка PCB типа А (SEQ ID NO: 23). Чтобы обеспечить аффинную очистку, в отобранных конфигурациях применяли С-метку.

- 25 Фрагменты ДНК, кодирующие белки по настоящему изобретению, были синтезированы (Genscript) и клонированы в вектор экспрессии pcDNA2004 (модифицированная плаزمида pcDNA3 с усиленным промотором CMV). В качестве платформы для экспрессии использовали клетки 293Freestyle (Life Technologies) в 24-луночных планшетах с глубокими лунками. Клетки транзientно трансфицировали с
- 30 использованием 293Fectin (Life Technologies) в соответствии с инструкциями

производителя и культивировали в течение 5 дней при 37 °C и 10% CO₂. Для RSV180910 (SEQ ID NO: 7), RSV180916 (SEQ ID NO: 8), RSV180907 (SEQ ID NO: 13), RSV180913 (SEQ ID NO: 14), RSV190417 (SEQ ID NO: 15), RSV190414 (SEQ ID NO: 16) и RSV190420 (SEQ ID NO: 17) на Фиг. 2Б и Фиг. 2В показана клеточная котрансфекция плазмидой, кодирующей F-белок РСВ, и плазмидой, кодирующей фурин, в соотношении 9 : 1, для повышения эффективности расщепления фурином. Культуральный супернатант собирали и подвергали центрифугированию в течение 5 минут при 300 g для удаления клеток и клеточного дебриса. Затем центрифугированный супернатант (надосадочную жидкость) подвергали стерильной фильтрации с использованием вакуумного фильтра с размером пор 0,22 мкм и хранили при 4 °C перед использованием.

Систему Octet для вычислительного анализа (биослойная интерферометрия) использовали для измерения концентрации белка в надосадочных жидкостях в день сбора и через 7 или 30 дней хранения при 4 °C. CR9501 (антитело, специфически распознающее F-белок РСВ в конформации «до слияния», которое содержит переменные области антител 58C5, как описано в WO 2012/006596) и CR9506 (антитело, распознающее F-белок РСВ в конформации «до слияния» и «после слияния» и содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 21, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 22) подвергали биотинилированию по стандартным протоколам и иммобилизовали на стрептавидиновых биосенсорах (ForteBio, Portsmouth, Великобритания). Для иммобилизации на биосенсорах антитела ADI-15644, специфичного для белковой конформации «после слияния» (Gilman et al., 2016), использовали сенсоры к человеческому Fc.

После этого биосенсоры с покрытием блокировали в супернатанте имитационной (mock) клеточной культуры. Количественный эксперимент проводили следующим образом: температура 30 °C, скорость встряхивания 1000 об/мин, время анализа 300 с. Концентрацию белка рассчитывали, используя стандартную кривую. Стандартную кривую строили для каждого антитела покрытия CR9501 и CR9506 с использованием F_A-белка РСВ в конформации «до слияния» (SEQ ID NO: 19; описание ранее в WO 17174568), разбавленного mock средой. Для ADI-15644 определяли равновесное связывание (Фиг. 2А) или начальную скорость связывания в секунду (Фиг. 2В). На Фиг. 2В показан положительный контроль связывания с F-белком РСВ в

конформации «после слияния», поэтому 20 мкг F-белка PCB в конформации «после слияния» (SEQ ID NO: 20) вносили в супернатант культуры моск-трансфицированных клеток и проводили измерения. Анализ данных был выполнен с использованием программного обеспечения ForteBio Data Analysis 10.0.1.6 (ForteBio).

5 Результаты и обсуждение

Все варианты показали экспрессию F-белка (Фиг. 2), измеренную по связыванию с CR9506. Нестабилизированный F-белок PCB типа В (RSV181177, SEQ ID NO: 3) показал в день сбора очень низкую экспрессию в конформации «до слияния», что было измерено по связыванию с Mab CR9501, и этот F-белок в конформации «до слияния» также был очень нестабильным из-за потери связывания с CR9501 после хранения надосадочной жидкости при 4 °C в течение 7 дней (Фиг. 2А). Кроме того, относительно более высокое количество F-белка в конформации «после слияния» было обнаружено с помощью Mab ADI-15644 для нестабилизированного F-белка. Общее количество полипептида в надосадочной жидкости и количество полипептида в конформации «до слияния» можно было увеличить с помощью стабилизационных мутаций I152M и K226M (RSV181178 (SEQ ID NO: 4)) (Фиг. 2А). Стабильность в надосадочной жидкости в течение 7 дней была дополнительно увеличена с помощью стабилизационных мутаций D486N (RSV181179; SEQ ID NO: 5) и S215P (RSV180915; SEQ ID NO: 6). Последующее добавление стабилизирующих мутаций L203I и P101Q еще больше увеличило уровни экспрессии и уменьшило количество полипептида в конформации «после слияния» до с трудом обнаруживаемых величин (RSV180916; SEQ ID NO: 8) (Фиг. 2А). Введение стабилизирующих мутаций D489Y, T357R и N371Y (RSV180917 и SEQ ID NO: 9) снижало уровни экспрессии. Когда впоследствии P101Q (RSV181180 (SEQ ID NO: 10) и D489Y (RSV181181 (SEQ ID NO: 11) и T357R + N371Y (RSV181182 (SEQ ID NO: 12) добавляли к стабилизированному варианту F-белка с вариантами F-белка I152M, K226M, D486N и S215P (RSV180915), повышения уровня экспрессии не наблюдалось, но стабильность увеличивалась, поскольку после 7 дней хранения при 4 °C не обнаруживалось наличие F-белка в конформации «после слияния».

Затем оценивали влияние сигнального пептида на экспрессию F-белка PCB путем сравнения сигнального пептида F-белка PCB типа А (SEQ ID NO: 23) с сигнальным пептидом F-белка PCB типа В (SEQ ID NO: 24). В вариантах F_В-белка PCB

с С-меткой на С-конце или без нее уровни экспрессии (связывание с CR9506) и содержание белка в конформации «до слияния» (связывание с CR9501) были выше, когда для экспрессии использовали сигнальный пептид F-белка РСВ типа А (например, как в SEQ ID NO: 8 и 14) (Фиг. 2Б).

5 В вариантах, отображенных на Фиг. 2В, метка отсутствует. Вариант RSV1800913 (SEQ ID NO: 14) со стабилизирующими мутациями I152M, K226M, D486N, S215P, L203I и P101Q продемонстрировал высокое связывание со специфическим по отношению к конформации «до слияния» Mab CR9501, и в день сбора не было обнаружено следов F-белка в конформации «после слияния». После 30-
10 дневного хранения при 4 °C уровни конформации «до слияния» не снижались.

Внедрение D489Y (RSV190417; SEQ ID NO: 15) привело к эффектам, аналогичным для RSV180913. Последующая обратная мутация на консенсусную замену K226 (RSV190414; SEQ ID NO: 16) приводит к слегка сниженной экспрессии в надосадочной жидкости. Эти варианты были дополнительно исследованы после
15 очистки (пример 4). Дрейфовые мутации L172Q и S173L (RSV190420 (SEQ ID NO: 17)) не влияли на экспрессию и уровень конформации «до слияния», и этот вариант был дополнительно исследован после очистки (пример 4). После хранения надосадочной жидкости в течение 30 дней при 4 °C не обнаруживали никакого связывания с F-белком в конформации «после слияния».

20 **Пример 3. Производство и очистка выбранных вариантов**

Фрагменты ДНК, кодирующие белки по настоящему изобретению, были синтезированы (Genscript) и клонированы в вектор экспрессии pcDNA2004 (модифицированная плазмида pcDNA3 собственной разработки с усиленным промотором CMV).

25 Клетки HEK293 использовали в качестве платформы для экспрессии RSV180915 (SEQ ID NO: 6), RSV180916 (SEQ ID NO: 8), RSV180917 (SEQ ID NO: 9), RSV181180 (SEQ ID NO: 10), RSV181181 (SEQ ID NO: 11), RSV181182 (SEQ ID NO: 12), RSV190414 (SEQ ID NO: 16), RSV190420 (SEQ ID NO: 17) и RSV200125 (SEQ ID NO: 18).

RSV190414 (SEQ ID NO: 16), RSV190420 (SEQ ID NO: 17) и RSV200125 (SEQ ID NO: 18) котрансфицировали с 10% кодирующей фурин плазмидой, чтобы увеличить ранее наблюдаемый неполный процессинг.

Клетки подвергали транзientной трансфекции с использованием 293Fectin (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя и культивировали в течение 5 дней при 37 °C и 10% CO₂. Культуральный супернатант собирали и подвергали центрифугированию в течение 5 минут при 300 g для удаления клеток и клеточного дебриса. Затем центрифугированный супернатант (надосадочную жидкость) подвергали стерильной фильтрации с использованием вакуумного фильтра с размером пор 0,22 мкм и хранили при 4 °C перед использованием.

Белки очищали с использованием двухэтапного протокола очистки, включающего использование аффинной колонки CaptureSelect™ либо для полипептидов с С-меткой RSV180915 (SEQ ID NO: 6), RSV180916 (SEQ ID NO: 8), RSV180917 (SEQ ID NO: 9), RSV181180 (SEQ ID NO: 10), RSV181181 (SEQ ID NO: 11) и RSV181182 (SEQ ID NO: 12), либо для белков без метки RSV190414 (SEQ ID NO: 16), RSV190420 (SEQ ID NO: 17) и RSV200125 (SEQ ID NO: 18), методом катионного обмена при pH 5,0 (колонка HiTrap Capto SP ImpRes; GE Life Sciences, Pittsburgh, PA, США). Все белки дополнительно очищали методом эксклюзионной хроматографии с использованием колонки Superdex 200 (GE Life Sciences, Pittsburgh, PA, США).

Клетки HEK293E 253 использовали в качестве платформы для экспрессии RSV180913 (SEQ ID NO: 14) в больших масштабах. Через 6 дней среду, содержащую белок, собирали путем низкоскоростного центрифугирования (10 минут, 1000 g) с последующим высокоскоростным центрифугированием (10 минут, 4000 g). Кондиционированную среду концентрировали с использованием полуволоконного картриджа Quixstand 30 кДа. Затем концентрированную среду подвергали диалитриции против 1 л PBS (фосфатно-солевого буфера) и 1 л 20 mM NaOAc, 100 mM NaCl, pH 5,0. Агрегаты удаляли центрифугированием и концентрированную диалитрованную среду разбавляли в соотношении 1 : 1 буфером 20 mM NaOAc, pH 5,0. Затем F-белки в конформации «до слияния» дополнительно очищали методом катионного обмена при pH 5,0 (10 мл Capto SP-Impres в колонке XK16 (GE Life Sciences, Pittsburgh, PA, США) с последующей анионообменной хроматографией с использованием колнки Resource-Q (GE Life Sciences, Pittsburgh, PA, США), pH 8. В

конец белок дополнительно очищали методом гель-фильтрации с использованием колонки Superdex200 16/600 (GE Life Sciences, Pittsburgh, PA, США).

Результаты и обсуждение

Несколько стабилизированных вариантов F-белка PCB типа В в конформации «до слияния» (F_В-белки PCB) очищали методом ионного обмена с последующей эксклюзионной хроматографией (SEC) (Фиг. 3). Основной пик при объемах около 11,5–13 мл для RSV180915, RSV180916 и RSV180917 при объемах 65 мл для RSV190420, RSV180913 и RSV200125 соответствуют тримерному F_В-белку PCB в конформации «до слияния».

Пример 4. Характеристика и стабильность тримеров F-белка типа В в конформации «до слияния»

ДСН-ПААГ анализ и Вестерн-блоттинг

Выбранные репрезентативные очищенные белки из примера 3 анализировали на 4–12% (масс./об.) гелях Bis-Tris NuPAGE, 1 x MOPS (3-[N-

Морфолино]пропансульфоновая кислота) (Life Technologies) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, окрашивание Кумасси. Для вариантов F-белков, которые были трансфицированы без котрансфекции с фурином (RSV180915, RSV180916 и RSV180917), анализ Вестерн-блоттинг проводили следующим образом. Полусухой блоттинг проводили в соответствии с рекомендациями производителей.

Блокирование в течение 1 часа в 5%-ом блокаторе для блоттинга в TBS-Tween (5%-й блокатор для блоттинга (BGB)), 1-е антитело (CR9506 1 : 10 000 в 5% BGB): инкубация в течение ночи; 2-е антитело (α -человеческий IgG CW800 (Rockland Immunochemicals, Inc., Limerick, PA, США) 1 : 5000 в 5%): инкубация в течение 1 ч. Все инкубации проводили на роликовой платформе при комнатной температуре. После первого и второго антитела блоты трижды промывали с использованием 10 мл TBS/0,05% Tween20 для каждой промывки в течение 5 минут с последующей окончательной промывкой с использованием 10 мл PBS. Блоты визуализировали посредством сканирования на сканере Odyssey с использованием обоих каналов 700CW и 800CW. Интенсивность сканирования для каналов 700CW и 800CW была установлена на отметке 5. Качество сканирования установлено на среднем уровне.

Результаты и обсуждение

На Фиг. 4А неполный процессинг в F1 и F2 был обнаружен у белков, которые продуцировались в клетках 293НЕК без котрансфекции с фурином. Соответствующая полоса обозначена F1+p27 на Фиг. 4А. Очищенные белки, полученные после котрансфекции с фурином, показали одну полосу на ожидаемой высоте для эктодоменов F1 и F1+F2 на восстановленных и невосстановленных гелях соответственно (Фиг. 4 Б и В).

Тримерное содержание в F-белках РСВ типа В в конформации «до слияния»

Очищенные F_В-белки РСВ в конформации «до слияния» анализировали с помощью аналитической SEC для подтверждения их чистоты и тримерной природы.

Для RSV180915 (SEQ ID NO: 6), RSV180916 (SEQ ID NO: 8), RSV180917 (SEQ ID NO: 9), RSV181180 (SEQ ID NO: 10), RSV181181 (SEQ ID NO: 11) и RSV181182 (SEQ ID NO: 12) анализ проводили с использованием установки для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) серии Infinity 1260 (Agilent). 40 мкг каждого очищенного белка пропускали (1 мл/мин) через колонку TSK gel G3000SWxl (Sigma-Aldrich). Элюирование контролировали с помощью УФ-детектора (Thermo Fisher Scientific), детектора светорассеяния (LS) μ Dawn (Wyatt Technologies), детектора показателя преломления (RI) μ T-rEx (Wyatt Technologies) и детектора динамического светорассеяния (DLS) Nanostar (Wyatt Technologies). Время удерживания тримерного белка – около 6,5 минуты. SEC-профили были проанализированы с помощью программного пакета Astra 7.3.2.19 (Wyatt Technology) (Фиг. 5).

Для RSV180913 (SEQ ID NO: 14), RSV190414 (SEQ ID NO: 16), RSV190420 (SEQ ID NO: 17) и RSV200125 (SEQ ID NO: 18) анализ проводили с помощью ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ) с использованием системы Vanquish (ThermoFisher Scientific) с колонкой Sepax Unix-C SEC-300 4,6X150 мм, 1,8 мкм (Sepax (231300-4615), вводимый объем 20 мкл, скорость протекания 0,3 мл/мин). Элюирование контролировали с помощью УФ-детектора (Thermo Fisher Scientific), детектора светорассеяния (LS) μ Dawn (Wyatt Technologies), детектора показателя преломления (RI) μ T-rEx (Wyatt Technologies) и детектора динамического светорассеяния (DLS) Nanostar (Wyatt Technologies). Время удерживания тримерного белка – около 4,5 минуты. SEC-профили были проанализированы с помощью

программного пакета Astra 7.3.2.19 (Wyatt Technology), а хроматограммы были построены с использованием GraphPad Prism (версия 8) (Фиг. 5).

Результаты и обсуждение

5 Все варианты F_B-белков PCB в конформации «до слияния» показали высокое содержание тримера. У RSV181181 (SEQ ID NO: 11) и RSV181182 (SEQ ID NO: 12) наблюдали незначительные количества агрегатов (Фиг. 5).

Стабильность и тримерное содержание в F_B-белках PCB в конформации «до слияния» при 37 °C в течение 35 дней

10 Содержание тримеров F_B-белков PCB после хранения в течение 35 дней при 37 °C оценивали с помощью аналитической SEC для оценки стабилизирующего вклада различных мутаций.

Для RSV180915 (SEQ ID NO: 6), RSV180916 (SEQ ID NO: 8) и RSV181917 (SEQ ID NO: 9) анализ проводили с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), подробности см. выше в разделе о способах.

15 Для RSV181180 (SEQ ID NO: 10), RSV181181 (SEQ ID NO: 11) и RSV181182 (SEQ ID NO: 12) анализ проводили с использованием ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ), подробности см. выше в разделе о способах.

Результаты и обсуждение

20 После хранения очищенных F_B-белков PCB в конформации «до слияния» при 37 °C в течение 35 дней RSV180915 (SEQ ID NO: 6), RSV180916 (SEQ ID NO: 8), RSV180917 (SEQ ID NO: 9) и RSV181182 (SEQ ID NO: 12) варианты оставались стабильными, что оценивали посредством аналитической SEC (Фиг. 6). RSV181180 (SEQ ID NO: 10) и RSV181181 (SEQ ID NO: 11) содержали повышенное количество агрегатов по сравнению с не подвергнутым стрессу материалом (Фиг. 5), что позволяет предположить, что мутация L203I важна для долгосрочной стабильности.

25 Стабилизирующий эффект D489Y (RSV181181 (SEQ ID NO: 11)), а также T357R и N371Y (RSV181182 (SEQ ID NO: 12)) проявился в снижении степени агрегации по сравнению с RSV181180 (SEQ ID NO: 10).

Температурная стабильность полипептидов F PCB в зависимости от температуры плавления

Температуры плавления очищенных полипептидов RSV180915 (SEQ ID NO: 6), RSV180916 (SEQ ID NO: 8), RSV180917 (SEQ ID NO: 9), RSV181180 (SEQ ID NO: 10), RSV181181 (SEQ ID NO: 11), RSV181182 (SEQ ID NO: 12), RSV190913 (SEQ ID NO: 14), RSV190414 (SEQ ID NO: 16), RSV190420 (SEQ ID NO: 17) и RSV200125 (SEQ ID NO: 18) определяли с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF). Очищенный F-белок в конформации «до слияния» смешивали с оранжевым флуоресцентным красителем SYPRO (Life Technologies S6650) в 96-луночном оптическом планшете кПЦР. Оптимальную концентрацию красителя и белка определяли экспериментально (данные не представлены). Разведение белков выполняли в PBS, а образец отрицательного контроля, содержащий только краситель, использовали для вычитания референсных значений. Измерение проводили на установке для количественной ПЦР (Applied Biosystems ViiA 7) с использованием следующих параметров: управляемое изменение температуры – от 25 до 95 °C со скоростью 0,015 °C в секунду. Сбор данных производили непрерывно. Кривые плавления строили с использованием программного обеспечения GraphPad PRISM (версия 8), а значения T_{m50} (температуры плавления) рассчитывали с помощью программного пакета Spotfire (Tibco Software Inc.). Температуры плавления рассчитывали при 50% от максимума флуоресценции с использованием нелинейного уравнения сдвига EC50.

Результаты и обсуждение

Температуры плавления (T_{m50}) вариантов F_B-белков PCB в конформации «до слияния» с различными наборами стабилизирующих мутаций варьировались от 60 до 71 °C с двойным или одиночным пиком плавления, см. таблицу 2.

Таблица 2. Температурная стабильность очищенных полипептидов F PCB типа B в конформации «до слияния»

№	Полипептидная конфигурация	T _{m50} (°C)	
		Первое	Второе
RSV181177	Не стабилизированный	Н/П	Н/П
RSV181178	I152M+K226M	Н/П	Н/П
RSV181179	I152M+K226M+D486N	Н/П	Н/П
RSV180915	I152M+K226M+D486N+S215P	60,5	65,6
RSV180916	I152M+K226M+D486N+S215P+L203I+P101Q	—	66,6
RSV180917	I152M+K226M+D486N+S215P+L203I+P101Q+D489Y+T357R+N371Y	64	71,9

RSV181180	I152M+K226M+D486N+S215P+P101Q	~61	65,7
RSV181181	I152M+K226M+D486N+S215P+P101Q+D489Y	62	69,9
RSV181182	I152M+K226M+D486N+S215P+P101Q+D489Y+T357R+N371Y	62,5	71,6
RSV180913	I152M+K226M+D486N+S215P+L203I+P101Q	—	66,3
RSV190417	I152M+K226M+D486N+S215P+L203I+P101Q+D489Y	Н/П	Н/П
RSV190414	I152M+D486N+S215P+L203I+P101Q+D489Y	—	70,5
RSV190420	I152M+D486N+S215P+L203I+P101Q+D489Y+L172Q+S173L	—	70,6
RSV200125	I152M+D486N+S215P+L203I+P101Q+D489Y+L172Q+S173L+Q191R+I206M+Q209R	—	71

Н/П = неприменимо

Как правило, предпочтительной является высокая температура плавления с единичным пиком. В случае RSV190414 обнаружили наивысшую стабильность с единичным пиком плавления (SEQ ID NO: 16). Добавление дрейфовых мутаций в положениях 172, 173 (RSV190420 (SEQ ID NO: 17) и 191, 206 и 209 (RSV200125 (SEQ ID NO: 18)) не уменьшило стабильность.

Криостойкость тримеров PCB типа B в конформации «до слияния»

Тримеры F_B RSV RSV180913 (SEQ ID NO: 14), RSV190420 (SEQ ID NO: 17) и RSV200125 (SEQ ID NO: 18) диализировали с помощью буфера 1 для приготовления состава или буфера 2 для приготовления состава и в каждом случае состав разводили до концентрации белка PCB 0,3 мг/мл. Буферы 1 и 2 для приготовления состава являются ТРИС-буфером или фосфатным буфером соответственно. 0,75 мл каждого состава помещали в стеклянные инъекционные флаконы с резиновой пробкой и запечатывали алюминиевыми колпачками. Флаконы медленно замораживали до -70 °C в течение 24 часов. Затем образцы размораживали до комнатной температуры и анализировали с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии размеров (SEC). SEC-анализ выполняли с использованием ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ) с использованием системы Vanquish (ThermoFisher Scientific), подробности способа см. в предыдущем разделе относительно тримерного содержания.

Результаты и обсуждение

В буферах 1 и 2 для приготовления состава полипептиды после замораживания сохраняют тримерную структуру (Фиг. 7). RSV190420 и RSV200125 были очень стабильны в обоих буферах. Добавление стабилизирующих мутаций D489Y, как в

RSV190420 (SEQ ID NO: 17) и RSV200125 (SEQ ID NO: 18), снизило уровень потерь тримерной структуры после замораживания в буфере 2 для приготовления состава.

Пример 5. Антигенность предпочтительных полипептидов

Связывание антител с полипептидами RSV190913 (SEQ ID NO: 14), RSV190414 (SEQ ID NO: 16), RSV190420 (SEQ ID NO: 17) и RSV200125 (SEQ ID NO: 18) измеряли посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Сначала 96-луночные планшеты HB (поверхность лунок с высокой степенью связывания белка) с половинным объемом лунок (Perkin Elmer, № по каталогу 6002290) покрывали различными антителами (1 мкг/мл) в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), 50 мкл/лунка, после чего планшеты инкубировали в течение ночи при 4 °C. Используемые антитела, специфичные для белковой конформации «до слияния»: CR9501, ADI-18933, ADI-18882, ADI-18930, ADI-18928, ADI-15594, ADI-18889, ADI-18913 и ADI-15617 (Gilman et al., 2016), RSD5-GL (Jones et al., 2019) и hRSV90 (Mousa et al., 2017). Используемое антитело, связывающее белки в конформации «до слияния» и «после слияния»: CR9506, содержащее вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 21, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 22). Используемое антитело, специфичное к белковой конформации «после слияния»: ADI-15644 (Gilman et al. 2016). После инкубации в течение ночи планшеты промывали 3 раза с использованием 100 мкл промывочного буфера (PBS + 0,05% Tween20). В каждую лунку добавляли 100 мкл блокирующего буфера (2% бычьего сывороточного альбумина (BSA), 0,05% Tween20 в PBS), после чего планшеты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре со встряхиванием. Затем планшеты промывали 3 раза с использованием 100 мкл промывочного буфера (PBS + 0,05% Tween20). Для подготовки образцов белковые образцы сначала разбавляли до концентрации 4 мкг/мл в буфере для анализа (1% BSA, 0,05% Tween20 в PBS). Образцы в концентрации 4 мкг/мл разбавляли еще в 4 раза посредством добавления 250 мкл разведения к 750 мкл буфера для анализа. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре со встряхиванием. После инкубации планшеты промывали 3 раза с использованием 300 мкл промывочного буфера. В каждую лунку в концентрации 0,05 мкг/мл добавляли 50 мкл раствора со связывающим антителом CR9506, специфичным для белковых конформаций «до слияния» и «после слияния», с меткой, представляющей собой пероксидазу хрена (HRP). Планшеты инкубировали в

течение 1 часа при комнатной температуре со встряхиванием. После инкубации планшеты промывали 3 раза с помощью 300 мкл промывочного буфера и в каждую лунку добавляли 20 мкл субстрата POD (пероксидазы). Проводили измерения в планшетах (оборудование для считывания люминесцентных сигналов EnSight

- 5 Multimode Plate reader, HH34000000) через 5–15 минут после добавления субстрата. Кривую для ИФА (соотношение разведения белка и количества относительных световых единиц (RLU)) строили в GraphPad Prism, а GraphPad Prism использовали для расчета значений IC50 (половинная максимальная концентрация ингибирования) (таблица 3).

10 **Таблица 3.** Значения IC50 вариантов F PCB

IC50 (log мкг/мл)	Специфичность	Антигенный сайт	RSV150042		RSV150043		RSV180913		RSV190414	RSV190420		RSV200125
			n = 2	CO	n = 2	CO	n = 2	CO	n = 1	n = 2	CO	n = 1
CR9501	конформация «до слияния»	V/Ø	0,139	0,050	HC	HC	0,221	0,135	0,179	0,160	0,042	0,124
CR9506	конформация «до слияния» + конформация «после слияния»	II	0,077	0,025	0,092	0,043	0,126	0,094	0,148	0,074	0,009	0,064
ADI-15644	конформация «после слияния»	H/Π	HC	H/Π	0,026	0,010	HC	H/Π	HC	HC	H/Π	HC
ADI-18933	конформация «до слияния»	Ø**	0,156	0,048	HC	HC	0,243	0,169	0,259	HC	H/Π	HC
ADI-18882			0,106	H/Π	HC	HC	0,082	H/Π	H/Π	0,092	H/Π	0,081
ADI-18930			0,114	0,046	HC	HC	0,112	0,068	0,086	0,082	0,019	0,063
ADI-18928			0,178	0,035	HC	HC	0,210	0,170	0,138	0,152	0,066	0,107
ADI-15594			0,048	0,022	HC	HC	0,050	0,023	0,042	0,042	0,000	0,048
ADI-18889			0,114	0,035	HC	HC	0,123	0,080	0,091	0,087	0,019	0,073
ADI-18913			0,033	0,007	HC	HC	0,241	0,167	0,119	0,170	0,064	0,347
ADI-15617			0,142	0,060	HC	HC	0,166	0,097	0,164	0,115	0,002	0,106
RSD5-GL			0,024	0,005	HC	HC	0,034	0,017	0,029	0,025	0,003	0,022
hRSV90			конформация «до слияния»	V	0,151	0,095	HC	HC	0,201	0,121	0,175	HC

n — число экспериментов; CO — стандартное отклонение; Н/П — неприменимо; НС — нет связывания; **в литературе описан нулевой сайт связывания

Результаты и обсуждение

Ни один из очищенных тримеров F_B PCB в конформации «до слияния» не показал связывания с моноклональным антителом, специфичным для конформации «после слияния», ADI-15644, тогда как белок в конформации «после слияния»

5 RSV150043 (SEQ ID NO: 20) связывался с таким антителом. Значения IC₅₀ F-белков PCB в конформации «до слияния» RSV RSV190913 (SEQ ID NO: 14), RSV190414 (SEQ ID NO: 16), RSV190420 (SEQ ID NO: 17), RSV200125 (SEQ ID NO: 18) и RSV150042 (SEQ ID NO: 19) были сопоставимы при использовании CR9501, CR9506, ADI-18882, ADI-18930, ADI-18928, ADI-15594, ADI-18889, ADI-15617 и RSD5-GL.

10 У специфичных к конформации «до слияния» антител ADI-18933 и hRSV90 не наблюдали связывания с RSV190420 (SEQ ID NO: 17) и RSV200125 (SEQ ID NO: 18), что можно объяснить различиями этих белков в областях узнавания антител по сравнению с RSV180913 (SEQ ID NO: 14) и RSV190414 (SEQ ID NO: 16). Кроме того, не наблюдали связывания RSV200125 (SEQ ID NO: 18) с моноклональным антителом
15 ADI-18913, специфичным к конформации «до слияния», что можно объяснить отличиями на поверхности областей узнавания антител у этого белка по сравнению с RSV180913 (SEQ ID NO: 14), RSV190414 (SEQ ID NO: 16) и RSV190240 (SEQ ID NO: 17).

Пример 6. Экспрессия и стабильность полноразмерных мембраносвязанных

20 *вариантов F_B PCB после транзientной трансфекции в клетках exptHEK293F*

Полноразмерные нестабилизированные F_B-белки PCB в процессированной (SEQ ID NO: 25) или в одноцепочечной форме (SEQ ID NO: 26) использовали в качестве контроля экспрессии и стабильности. Эти последовательности были основаны на консенсусной последовательности для подгруппы В (SEQ ID NO: 1), которая содержит
25 N-концевой сигнальный пептид, характерный для F PCB типа А (SEQ ID NO: 23). С-концевой лизиновый остаток SEQ ID NO: 1 был заменен на аспарагин, соответствующий остаток, находящийся в F-белках PCB типа А, для предотвращения отсечения лизина на С-конце. Стабилизированные полноразмерные варианты этих F-полипептидов PCB типа В содержали 6 стабилизирующих аминокислотных замен (т. е. P101Q, I152M, L203I, S215P, D486N и D489Y); (SEQ ID NO: 29) для процессированного
30 варианта и 5 стабилизирующих аминокислотных замен (т. е. P101Q, I152M, L203I, S215P и D486N) (SEQ ID NO: 30) для одноцепочечного варианта соответственно.

Фрагменты ДНК, кодирующие полноразмерные F_B-белки PCB (SEQ ID NO: 25, 26, 29, 30, 32 и 34), были синтезировали (Genscript) и клонированы в вектор экспрессии pcDNA2004 (модифицированная плаزمида pcDNA3 с усиленным промотором CMV). В качестве платформы для экспрессии использовали клетки expi293Freestyle (Life Technologies) в шейкерных колбах на 100 мл. Клетки подвергали транзientной трансфекции с использованием ExpiFectamine (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя, после чего их культивировали в течение 2 дней при 37 °C и 10% CO₂. Клетки собирали с помощью центрифугирования в течение 5 минут при 300 g и ресуспендировали в PBS. Для измерения стабильности F-белков в конформации «до слияния» клетки подвергали 10-минутному тепловому стрессу при 37 °C или при 55 °C.

Сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS) использовали для измерения экспрессии F_B-белка PCB в конформации «до слияния» на плазматической мембране после теплового стресса. CR9501 был флуоресцентно помечен с помощью Alexa488 по стандартным протоколам. Клетки окрашивали в течение 30 минут при концентрации 2,5 мкг/мл CR9501, промывали и анализировали с помощью FACS Canto II. Анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения FlowJo версии 10.6.2.

Результаты и обсуждение

Как процессированный, так и одноцепочечный F_B-белок PCB дикого типа (PR_дикийтип и SC_дикийтип соответственно) демонстрировали экспрессию в конформации «до слияния» на клеточной поверхности после инкубации при 37 °C, что определяли по связыванию с Mab CR9501 (Фиг. 8). Связывание Mab CR9501 с F-белком в конформации «до слияния» снижалось после инкубации при 55 °C, что указывает на нестабильность обеих версий F_B-белков PCB дикого типа (Фиг. 8). Как процессированный, так и одноцепочечный F_B-белок PCB, содержащие стабилизирующие мутации по настоящему изобретению (PR_стабилизированный (SEQ ID NO: 32) и SC_стабилизированный (SEQ ID NO: 34) соответственно), демонстрировали повышенную экспрессию в конформации «до слияния» на клеточной поверхности после инкубации при 37 °C по сравнению с белками дикого типа. Более того, связывание не снижалось после инкубации при 55 °C, что подтверждало, что обе

версии стабилизированных F_B-белков РСВ действительно обладали повышенной стабильностью.

Пример 7. Белок типа В (RSV190420, SEQ ID NO: 17) в конформации «до слияния» иммуногенен у мышей и хлопковых хомяков и дозозависимо индуцирует антитела, способные нейтрализовать штаммы РСВ А и РСВ В

Мышей Balb/c внутримышечно иммунизировали посредством введения 15, 5 или 1,5 мкг белка RSV190420 без адъюванта на день 0 и день 28 (n = 6 в каждой группе). Хлопковых хомяков внутримышечно иммунизировали посредством введения 50 или 5 мкг RSV190420 без адъюванта или 5 мкг RSV190420 с адъювантом AdjuPhos на день 0 и день 28 (n = 10 в каждой группе). Контрольные группы получали внутримышечную иммунизацию посредством введения буфера для приготовления состава (FB) (n = 3 для мышей, n = 7 для хлопковых хомяков). Реакцию антител, нейтрализующих вирус, измеряли на день 42 для мышей или на день 49 для хлопковых хомяков. Ответы измеряли с использованием анализа на основе люциферазы светлячков (FFL) для штаммов РСВ А CL57 или В1 с использованием теста на уменьшение и нейтрализацию бляшкообразования (PRNT) для штаммов РСВ А2 или РСВ В Wash или с использованием анализа микронеutralизации (MN) для клинических изолятов РСВ В 11-052099 и РСВ В 17-058221.

Результаты и обсуждение

Внутримышечная иммунизация мышей или хлопковых хомяков белком типа В в конформации «до слияния» RSV190420 приводит к дозозависимой индукции антител, которые были способны нейтрализовать различные штаммы РСВ А и РСВ В, что определяли с использованием различных типов анализов на нейтрализацию вируса (Фиг. 9). Эти результаты демонстрируют, что белок типа В в конформации «до слияния» является иммуногенным у грызунов и индуцирует перекрестно-нейтрализующие антитела.

Пример 8. Белок типа В (RSV200125, SEQ ID NO: 18) в конформации «до слияния» является иммуногенным у хлопковых хомяков и индуцирует защиту от заражения РСВ А2 или РСВ В Wash

Хлопковых хомяков внутримышечно иммунизировали посредством введения 50, 5 или 1 мкг RSV200125 без адъюванта на день 0 и день 28 (n = 7 на каждую группу на каждый тестовый вирус). Контрольная группа получила внутримышечную

иммунизацию буфером для приготовления состава (FB) ($n = 7$). Животных интраназально заражали на день 49 день РСВ А2 или на день 50 РСВ В Wash. Через пять дней после заражения выделяли ткани легких и носа и определяли вирусную нагрузку в гомогенатах легких и носа посредством анализа бляшкообразования.

- 5 Сыворотку крови перед контрольным заражением выделяли на день 49 или день 50, а ответы антител, нейтрализующих вирус, измеряли с использованием анализа на основе люциферазы светлячков (FFL) для штаммов РСВ А CL57 или РСВ В1 (только образцы, взятые на день 49) или с использованием теста на уменьшение и нейтрализацию бляшкообразования (PRNT) для штаммов РСВ А2 или РСВ В Wash (объединенные образцы, взятые на день 49 и день 50).

Результаты и обсуждение

У большинства хлопковых хомяков, иммунизированных внутримышечно любой из указанных доз белка типа В RSV200125 в конформации «до слияния», не обнаруживали вирусную нагрузку в легких после заражения РСВ А2 или РСВ В Wash.

- 15 В носовой полости, напротив, наблюдалась ограниченная защита от РСВ А2, а также в носовой полости наблюдалась дозозависимая частичная защита от провокационного введения РСВ В Wash (Фиг. 10А). Посредством различных видов анализа на нейтрализацию вирусов на основе FFL (Фиг. 10Б) или посредством анализа PRNT (Фиг. 10В) в сыворотке крови перед заражением обнаруживались антитела к РСВ, способные 20 нейтрализовать различные штаммы РСВ А и РСВ В. Эти результаты демонстрируют, что белок типа В в конформации «до слияния» является иммуногенным и индуцирует защиту в моделях провокационного введения РСВ А2 и РСВ В Wash у хлопковых хомяков.

- Пример 9.** *Кодируемый аденовирусным вектором одноцепочечный и процессированный белок типа В РСВ в конформации «до слияния» индуцирует клеточные и гуморальные иммунные ответы у мышей*

- Мышей Balb/c внутримышечно иммунизировали посредством введения 10^8 , 10^9 или 10^{10} вирусных частиц (ВЧ), кодирующих одноцепочечный Ad26.RSV.preF-B (стабилизированный F_В-белок РСВ в конформации «до слияния» с SEQ ID NO: 34 или процессированный вариант Ad26.RSV.preF-B (стабилизированный F_В-белок РСВ с SEQ ID NO: 32) на день 0 ($n = 5$ в каждой группе). Контрольная группа получила внутримышечную иммунизацию буфером для приготовления состава (FB) ($n = 3$).

Сыворотку крови, выделенную через 6 недель после иммунизации, анализировали на нейтрализующие вирус антитела с использованием анализа на основе люциферазы светлячков (FFL) для штаммов РСВ А2, РСВ А CL57 или РСВ В1 и с использованием теста на уменьшение и нейтрализацию бляшкообразования (PRNT) для штаммов РСВ А2 или для клинического изолята РСВ В 18-006171. Спленоциты, выделенные через 6 недель после иммунизации указанными векторами или буфером для приготовления состава, стимулировали пулами пептидов, охватывающими последовательность F-последовательность из РСВ А2, а ответы IFN- γ , направленные к F РСВ, измеряли методом ELISPOT.

Результаты и обсуждение

Внутримышечная иммунизация мышей аденовирусным вектором, кодирующим белок типа В в конформации «до слияния», либо в процессированном, либо в одноцепочечном варианте, приводит к дозозависимой индукции нейтрализующих вирус антител. В то время как наблюдали относительно низкий уровень ответов на штаммы РСВ А, с легкостью обнаруживали четкие дозозависимые ответы на различные штаммы РСВ В (Фиг. 11А и 11Б). Высокий уровень клеточных ответов, направленных к F-белкам РСВ, индуцировали после однократной иммунизации обоими векторами (Фиг. 11В).

Пример 10. Иммуногенность и защитная эффективность белков типа В в конформации «до слияния» RSV190414 (SEQ ID NO: 16), RSV190420 (SEQ ID NO: 17) и RSV200125 (SEQ ID NO: 18) у хлопковых хомяков

F_В-белки РСВ в конформации «до слияния» вводили хлопковым хомякам в дозе 50 мкг путем внутримышечной иммунизации на день 0 и день 28 (n = 10 на каждую группу). Контрольная группа получила внутримышечную иммунизацию буфером для приготовления состава (FB) (n = 7), и на день 49 животным провокационно интраназально вводили РСВ В 17-058221, недавно полученный клинический изолят штамма РСВ В. Вирусную нагрузку в легких и носу определяли с помощью анализа бляшкообразования в гомогенатах тканей, выделенных через 5 дней после провокационного заражения (см. Фиг. 12А). Образцы сыворотки крови, взятые перед провокационным заражением, анализировали на наличие нейтрализующих антител к штаммам РСВ посредством анализа на основе люциферазы светлячков (Фиг. 12Б) или анализа микронеutralизации (Фиг. 12В). Символы показывают вирусную нагрузку или

нейтрализующие титры для отдельных животных, тогда как средние титры показаны горизонтальными линиями. Нижний предел обнаружения или ограничение обозначается пунктирной линией.

Результаты и обсуждение

5 Хлопковые хомяки, иммунизированные внутримышечно любым из различных F_B-белков в конформации «до слияния», не имели обнаруживаемой вирусной нагрузки в легких после провокационного введения РСВ В 17-058221. В то время как полную защиту в носовой полости наблюдали у животных, иммунизированных RSV2000125, в группах, иммунизированных RSV190420 или RSV190414, наблюдали несколько
10 животных с внезапной развившейся инфекцией носа (Фиг. 12А). В сыворотке крови с помощью анализов на нейтрализацию вирусов на основе FFL (Фиг. 12Б) или анализов микронейтрализации (Фиг. 12В) в сыворотке крови перед провокационным заражением обнаруживали антитела к РСВ, способные нейтрализовать различные штаммы РСВ А и РСВ В. Эти результаты демонстрируют, что различные белки типа В в конформации
15 «до слияния» являются иммуногенными и индуцируют защиту в моделях провокационного введения РСВ В 17-058221 у хлопковых хомяков.

Пример 11. *Иммуногенность и защитная эффективность Ad26, кодирующего процессированный белок типа В в конформации «до слияния» (SEQ ID NO: 32) у хлопковых хомяков*

20 Ad26.RSV-B.prgF вводили хлопковым хомякам в указанных дозах посредством внутримышечной иммунизации на день 0 (n = 6 или n = 7 на каждую группу). Контрольные группы получали внутримышечную иммунизацию буфером для приготовления состава (FB) (n = 7). Животным интраназально провокационно вводили на день 49 РСВ А2 или РСВ В 17-058221, недавно полученный клинический штамм
25 РСВ В. Вирусную нагрузку в легких и носу определяли с помощью анализа бляшкообразования в гомогенатах тканей, выделенных через 5 дней после провокационного заражения (см. Фиг. 13А). Образцы сыворотки крови, взятые перед провокационным заражением, анализировали на наличие нейтрализующих антител к штаммам РСВ с помощью анализа микронейтрализации (Фиг. 13Б). Символы
30 показывают вирусную нагрузку или нейтрализующие титры для отдельных животных, тогда как средние титры показаны горизонтальными линиями. Нижний предел обнаружения или ограничение обозначается пунктирной линией.

Результаты и обсуждение

Хлопковые хомяки, иммунизированные внутримышечно с помощью Ad26.RSV-B.preF, не имели обнаруживаемой вирусной нагрузки в легких после провокационного введения РСВ А2 или РСВ В 17-058221, при этом наблюдали всего несколько случаев прорывной легочной инфекции у животных, иммунизированных вакциной Ad26.RSV-B.preF в самой низкой дозировке. В носовой полости также наблюдали полную защиту от инфекции РСВ В 17-058221 при дозировке вакцины 10^7 вирусных частиц (ВЧ) и выше. Напротив, Ad26.RSV-B.preF не обеспечивал полной защиты носа после провокационного введения РСВ А2, хотя в носовой полости наблюдали зависимое от дозы вакцины снижение вирусной нагрузки в (Фиг. 13А). Антитела к РСВ, способные нейтрализовать штаммы РСВ А и РСВ В, обнаруживали в сыворотке крови перед провокационным введением с помощью анализов микронейтрализации (Фиг. 13Б). Эти результаты демонстрируют, что Ad26.RSV-B.preF является иммуногенным и индуцирует защиту в моделях заражения РСВ А2 и РСВ В 17-058221 у хлопковых хомяков.

Таблица 1. Стандартные аминокислоты, аббревиатуры и свойства

Аминокислота	3-буквенное обозначение	1-буквенное обозначение	Полярность боковой цепи	Заряд боковой цепи (pH 7,4)
аланин	Ala	A	неполярная	Нейтральный
аргинин	Arg	R	полярная	Положительный
аспарагин	Asn	N	полярная	Нейтральный
аспарагиновая кислота	Asp	D	полярная	Отрицательный
цистеин	Cys	C	неполярная	Нейтральный
глутаминовая кислота	Glu	E	полярная	Отрицательный
глутамин	Gln	Q	полярная	Нейтральный
глицин	Gly	G	неполярная	Нейтральный
гистидин	His	H	полярная	Положительный (10%) Нейтральный (90%)
изолейцин	Ile	I	неполярная	Нейтральный
лейцин	Leu	L	неполярная	Нейтральный
лизин	Lys	K	полярная	Положительный
метионин	Met	M	неполярная	Нейтральный
фенилаланин	Phe	F	неполярная	Нейтральный
пролин	Pro	P	неполярная	Нейтральный
серин	Ser	S	полярная	Нейтральный
треонин	Thr	T	полярная	Нейтральный
триптофан	Trp	W	неполярная	Нейтральный
тирозин	Tyr	Y	полярная	Нейтральный
валин	Val	V	неполярная	Нейтральный

Последовательности

Полноразмерная консенсусная последовательность F_B PCB (SEQ ID NO: 1)

5 MELLIHRSSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARRREAPQYMN
 YTINTTKNLNVSISKRRRFLGFLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKNALLSTN
 KAVVSLSNGVSVLTSTKVLDLKNYINNQLLPIVNQQSCRISNIETVIEFQQKNSRLLEITR
 EFSVNAGVTTPLSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKE
 EVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFF
 10 PQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLG
 AIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSTNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKNLY
 VKGEPIINYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVNTGKSTTNIMIT
 AIIIVIVVLLSLIAIGLLLYCKAKNTPVTLSKDQLSGINNIAFSK

15 **SEQ ID NO: 2 (фибрин)**

GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL

SEQ ID NO: 3 RSV181177 консенсусный растворимый полипептид F_B PCB с
 подчеркнутым сигнальным пептидом F_A PCB и фолдоном; p27 подчеркнут и выделен
 20 полужирным шрифтом; линкеры выделены курсивом; C-метка выделена полужирным
 шрифтом.

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARR**EAPQYM**
 25 **NYTINTTKNLNVSISKRRR**FLGFLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKNALLS
 TNKAVVSLSNGVSVLTSTKVLDLKNYINNQLLPIVNQQSCRISNIETVIEFQQKNSRLLEI
 TREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSII
 KEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVS
 FFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITS
 30 LGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSTNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKN
 LYVKGEPIINYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSA/IGGYIPEAPRDG
QAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEPEA

SEQ ID NO: 4 RSV181178

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARREAPQYMN
 YTINTTKNLNVSISKKRRRFLGFLGVSASMAVSKVLHLEGEVNIKNALLST
 NKAVVSLSNVSVLTSTKVLDLKNYINNQLLPIVNQQSCRISNIETVIEFQQMNSRLLEI
 5 TREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSII
 KEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVS
 FFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITS
 LGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKN
 LYVKGEPIINYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDG
 10 QAYVRKDGGEWVLLSTFLGGSEPEA

SEQ ID NO: 5 RSV181179

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARREAPQYMN
 15 YTINTTKNLNVSISKKRRRFLGFLGVSASMAVSKVLHLEGEVNIKNALLST
 NKAVVSLSNVSVLTSTKVLDLKNYINNQLLPIVNQQSCRISNIETVIEFQQMNSRLLEI
 TREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSII
 KEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVS
 FFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITS
 20 LGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKN
 LYVKGEPIINYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDG
 QAYVRKDGGEWVLLSTFLGGSEPEA

SEQ ID NO: 6 RSV180915

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARREAPQYMN
 YTINTTKNLNVSISKKRRRFLGFLGVSASMAVSKVLHLEGEVNIKNALLST
 NKAVVSLSNVSVLTSTKVLDLKNYINNQLLPIVNQQSCRIPNIETVIEFQQMNSRLLEI
 TREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSII
 30 KEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVS
 FFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITS
 LGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKN
 LYVKGEPIINYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDG
 QAYVRKDGGEWVLLSTFLGGSEPEA

SEQ ID NO: 7 RSV180910 (сигнал F_B PCB подчеркнут)

MELLIHRSSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKETKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTQAANNRARREAPQYMN
 5 YTINTTKNLNVSISKRRRFLGFLGVGSAIASGMAVSKVLHLEGEVNNIKNALLST
 NKAUVSLSNGVSVLTSTKVLDLKNYINNQILPIVNQQSCRIPNIETVIEFQQMNSRLLEIT
 REFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIK
 EEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSF
 FPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSL
 10 GAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKNL
 YVKGEPIINYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDG
 QAYVRKDGWVLLSTFLGGSEPEA

SEQ ID NO: 8 RSV180916

15 MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKETKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTQAANNRARREAPQYMN
 YTINTTKNLNVSISKRRRFLGFLGVGSAIASGMAVSKVLHLEGEVNNIKNALLST
 NKAUVSLSNGVSVLTSTKVLDLKNYINNQILPIVNQQSCRIPNIETVIEFQQMNSRLLEIT
 REFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIK
 20 EEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSF
 FPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSL
 GAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKNL
 YVKGEPIINYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDG
 QAYVRKDGWVLLSTFLGGSEPEA

SEQ ID NO: 9 RSV180917

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKETKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTQAANNRARREAPQYMN
 YTINTTKNLNVSISKRRRFLGFLGVGSAIASGMAVSKVLHLEGEVNNIKNALLST
 30 NKAUVSLSNGVSVLTSTKVLDLKNYINNQILPIVNQQSCRIPNIETVIEFQQMNSRLLEIT
 REFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIK
 EEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSF
 FPQADRCKVQSNRVFCDTMYSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSL
 GAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKNL

YVKGEPIINYDPLVFPSNEFYASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDG
QAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEPEA

SEQ ID NO: 10 RSV181180

5 MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTQAANNRARRREAPQYMN
YTINTTKNLNVSISKKRRRFLGFLGVSASMAVSKVLHLEGEVNIKNALLST
NKAVVSLSNGVSVLTSTKVLDLKNYINNQLLPIVNQQSCRIPNIETVIEFQQMNSRLLEI
TREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSII
10 KEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVS
FFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITS
LGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNKLEGKN
LYVKGEPIINYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDG
QAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEPEA

15

SEQ ID NO: 11 RSV181181

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
LSNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTQAANNRARRREAPQYMN
YTINTTKNLNVSISKKRRRFLGFLGVSASMAVSKVLHLEGEVNIKNALLST
20 NKAVVSLSNGVSVLTSTKVLDLKNYINNQLLPIVNQQSCRIPNIETVIEFQQMNSRLLEI
TREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSII
KEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVS
FFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITS
LGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNKLEGKN
25 LYVKGEPIINYDPLVFPSNEFYASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDG
QAYVRKDGEWVLLSTFLGGSEPEA

SEQ ID NO: 12 RSV181182

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
30 LSNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTQAANNRARRREAPQYMN
YTINTTKNLNVSISKKRRRFLGFLGVSASMAVSKVLHLEGEVNIKNALLST
NKAVVSLSNGVSVLTSTKVLDLKNYINNQLLPIVNQQSCRIPNIETVIEFQQMNSRLLEI
TREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSII
KEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVS

FFPQADRCKVQSNRVFCDTMYSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITS
 LGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKLEGKN
 LYVKGEPIINYDPLVFPSNEFYASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDG
 QAYVRKDG EWVLLSTFLGGSEPEA

5

SEQ ID NO: 13 RSV180907 (без метки)

MELLIHRSSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKETKCNGTDTKV KLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTQAANNRARRREAPQYMN
 YTINTTKNLNVSISKKRKR RFLGFLGVSASMAVSKVLHLEGEV N K IKNALLST
 10 NKA VVSLSNGVSVLT SKVLDLKNYINNQILPIVNQQSCRIPNIETVIEFQQMNSRLLEIT
 REFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIK
 EEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSF
 FPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSL
 15 GAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKLEGKNL
 YVKGEPIINYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDG
 QAYVRKDG EWVLLSTFL

SEQ ID NO: 14 RSV180913 (без метки)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 20 LSNIKETKCNGTDTKV KLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTQAANNRARRREAPQYMN
 YTINTTKNLNVSISKKRKR RFLGFLGVSASMAVSKVLHLEGEV N K IKNALLST
 NKA VVSLSNGVSVLT SKVLDLKNYINNQILPIVNQQSCRIPNIETVIEFQQMNSRLLEIT
 REFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIK
 EEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSF
 25 FPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSL
 GAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKLEGKNL
 YVKGEPIINYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDG
 QAYVRKDG EWVLLSTFL

30 **SEQ ID NO: 15** RSV190417 (без метки)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKETKCNGTDTKV KLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTQAANNRARRREAPQYMN
 YTINTTKNLNVSISKKRKR RFLGFLGVSASMAVSKVLHLEGEV N K IKNALLST
 NKA VVSLSNGVSVLT SKVLDLKNYINNQILPIVNQQSCRIPNIETVIEFQQMNSRLLEIT

REFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIK
 EEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSF
 FPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSL
 GAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKNL
 5 YVKGEPIINYDPLVFPSNEFYASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDG
 QAYVRKDG EWVLLSTFL

SEQ ID NO: 16 RSV190414 (без метки)

MELLILKANAITTILTA VTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 10 LSNIKETKCNGTDTKV KLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTQAANNRARRREAPQYMN
 YTINTTKNLNVSISKRRRFLGLLGVGSAIASGMAVSKVLHLEGEV N K I K N A L L S T
 N K A V V S L S N G V S V L T S K V L D L K N Y I N N Q I L P I V N Q Q S C R I P N I E T V I E F Q Q K N S R L L E I T
 REFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIK
 EEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSF
 15 FPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSL
 GAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKNL
 YVKGEPIINYDPLVFPSNEFYASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDG
 QAYVRKDG EWVLLSTFL

SEQ ID NO: 17 RSV190420 (без метки)

MELLILKANAITTILTA VTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKETKCNGTDTKV KLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTQAANNRARRREAPQYMN
 YTINTTKNLNVSISKRRRFLGLLGVGSAIASGMAVSKVLHLEGEV N K I K N A L Q L T
 N K A V V S L S N G V S V L T S K V L D L K N Y I N N Q I L P I V N Q Q S C R I P N I E T V I E F Q Q K N S R L L E I T
 25 REFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIK
 EEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSF
 FPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSL
 GAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKNL
 YVKGEPIINYDPLVFPSNEFYASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDG
 30 QAYVRKDG EWVLLSTFL

SEQ ID NO: 18 RSV200125 (без метки)

MELLILKANAITTILTA VTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKETKCNGTDTKV KLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTQAANNRARRREAPQYMN

YTINTTKNLNVSISKRRRFLGFLGVGSAIASGMAVSKVLHLEGEVNIKNALQLT
 NKA VVSLSNGVSVLT SRVLDLKNYINNQILPMVNRQSCRIPNIETVIEFQQKNSRLLEI
 TREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSII
 KEEVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVS
 5 FFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITS
 LGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKLEGKN
 LYVKGEPIINYDPLVFPSNEFYASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLSAIGGYIPEAPRDG
 QAYVRKDG EWVLLSTFL

10 **SEQ ID NO: 19** RSV150042 (PRPM)

MELLILKANAITTILTA VTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKEIKCNGTDAKV KLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNY
 TLNNAKKTNTVTL SKKRKR RFLGFLGVGSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLST
 NKA VVSLSNGVSVLT SKVLDLKNYIDKQLLP IVNKQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLLEI
 15 TREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSII
 KEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSV
 SFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVIT
 SLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKQEGK
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAPRD
 20 GQAYVRKDG EWVLLSTFL

SEQ ID NO: 20 RSV150043 (конфигурация «после слияния»)

MELLILKANAITTILTA VTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKENKCNGTDAKV KLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMN
 25 YTLNNAKKTNTVTL SKKRKRRAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKA VVSLSN
 GSVLT SKVLDLKNYIDKQLLP IVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGV
 TTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVV
 QLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETC
 KVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSC
 30 YGKTKCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTV SVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGE
 PIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELL

SEQ ID NO: 21 тяжелая цепь CR9506

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSRSLITWVRQAPGQGLEWMGEISLVFGS
 AKNAQKFQGRVTITADESTSTAHMEMISLKHEDTAVYYCAAHQYGSNGTHNNFWDES
 ELRFDLWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR
 5 VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSDGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK

10

SEQ ID NO: 22 легкая цепь CR9506

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTIACRASQSIGTYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV
 PSRFSGSGSGTHFTLAISLQAEDFATYSCQQSYTIPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
 15 SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 23 сигнальный пептид белка слияния PCB A
 MELLILKANAITTILTAVTFCFASG

20 **SEQ ID NO: 24** сигнальный пептид белка слияния PCB B
 MELLIHRSSAIFLTLAINALYLTSS

SEQ ID NO: 25 PR_дикий тип (полноразмерный белок слияния RSV B с сигнальным пептидом PCB-A как процессированный вариант)

25 MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNRARREAPQYMN
 YTINTTKNLNVSISKRRKRRFLGFLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKINALQLTN
 KAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYINNQLLPIVNQQSCRISNIETVIEFQQKNSRLLEITR
 EFSVNAGVTTPLSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKE
 30 EVLAYVVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFF
 PQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLG
 AIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKNLY
 VKGEPIINYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVNTGKSTTNIMIT
 AIIIVIVLLSLIAIGLLLYCKAKNTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

SEQ ID NO: 26 SC_дикийтип (полноразмерный белок слияния RSV B с сигнальным пептидом PCB-A как одноцепочечный вариант)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 5 LSNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTPAANNQARGSGSGRSL
 GFLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNNIKNALQLTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDL
 KNYINNQLLPIVNQQSCRISNIETVIEFQQKNSRLLEITREFSVNAGVTTPLSTYMLTNS
 ELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVLPIYGVIDTPCW
 KLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMN
 10 SLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGII
 KTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKNLYVKGEPIINYDPLVFPSDEFD
 ASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVNTGKSTTNIMITAIIIVIVVLLSLIAIGLLLYCK
 AKNTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

SEQ ID NO: 29 PR_стабилизированный (полноразмерный белок слияния RSV B с сигнальным пептидом PCB-A как процессированный вариант)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTQAANNRAREAPQYMN
 YTINTTKNLNVSISKRRRFLGFLLGVGSAIASGMAVSKVLHLEGEVNNIKNALQLT
 20 NKAIVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYINNQLLPIVNQQSCRIPNIETVIEFQQKNSRLLEIT
 REFSVNAGVTTPLSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIK
 EEVLAYVVLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSF
 FPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSL
 GAIVSCYGKTKCTASNKNRGIIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKNL
 25 YVKGEPIINYDPLVFPSNEFYASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVNTGKSTTNIMI
 TAIIVIVVLLSLIAIGLLLYCKAKNTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

SEQ ID NO: 30 SC_стабилизированный (полноразмерный белок слияния RSV B с сигнальным пептидом PCB-A как одноцепочечный вариант)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 30 LSNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTQAANNQARGSGSGRSL
 GFLLGVGSAIASGMAVSKVLHLEGEVNNIKNALQLTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDL
 KNYINNQLPIVNQQSCRIPNIETVIEFQQKNSRLLEITREFSVNAGVTTPLSTYMLTNS
 ELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVLPIYGVIDTPCW

KLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMN
 SLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGII
 KTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTRYVVKLEGKNLYVKGEPIINYDPLVFPSNEFD
 ASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVNTGKSTTNIMITAIIIVVLLSLAIGLLLYCK
 5 AKNTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

SEQ ID NO: 31 Ad26RSV019

ATGGAAGTCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACAATCCTGACCGCCGTGA
 CCTTTTGCTTCGCCAGCGGCCAGAACATCACCGAGGAATTCTACCAGAGCACCTG
 10 TAGCGCCGTGTCCAGAGGATATCTGTCTGCCCTGAGAACCGGCTGGTACACCAGC
 GTGATCACCATCGAGCTGAGCAACATCAAAGAAACAAAGTGCAACGGCACCGAC
 ACCAAAGTGAAGCTGATCAAGCAAGAGCTGGACAAGTACAAGAATGCCGTGACC
 GAACTGCAGCTGCTGATGCAGAATACCCAGGCCGCCAACACCGGGGCCAGAAGA
 GAAGCCCCTCAGTACATGAACTACACCATCAACACCACCAAGAACCTGAACGTGT
 15 CCATCAGCAAGAAGCGGAAGCGGAGATTCTGGGCTTTCTGCTCGGAGTGGGATC
 TGCCATTGCCTCTGGAATGGCCGTGTCTAAGGTGCTGCATCTGGAAGGCGAAGTG
 AACAAGATCAAGAACGCCCTGCAGCTGACCAACAAGGCCGTGGTGTCTCTGTCTA
 ATGGCGTGTCCGTGCTGACCAGCAGAGTGCTGGACCTGAAGAACTACATCAACA
 ACCAGCTGCTGCCCATGGTCAACCGGCAGAGCTGCAGAATCCCCAACATCGAGA
 20 CAGTGATCGAGTTCCAGCAGAAGAACAGCAGGCTGCTGGAAATCACCCGCGAGT
 TTTCTGTGAATGCCGGCGTGACAACCCCTCTGAGCACCTACATGCTGACCAATAG
 CGAGCTGCTGAGCCTGATCAACGACATGCCCATCACCAACGACCAGAAAAAGCT
 GATGAGCAGCAACGTGCAGATCGTGCGGCAGCAGAGCTACAGCATCATGAGCAT
 TATCAAAGAAGAGGTGCTGGCCTACGTGGTGCAGCTGCCTATCTACGGCGTGATC
 25 GATACCCCTTGCTGGAAGCTGCACACAAGCCCACTGTGCACCACCAATATCAAAG
 AGGGCAGCAACATCTGCCTGACCAGAACCGATAGAGGCTGGTACTGCGATAATG
 CCGGCAGCGTCAGCTTCTTCCACAAGCCGATACCTGCAAGGTGCAGAGCAACAG
 AGTGTCTGCGACACCATGAACAGCCTGACACTGCCTAGCGAGGTGTCCCTGTGC
 AACACCGACATCTTCAACTCTAAGTACGACTGCAAGATCATGACCTCCAAGACCG
 30 ACATCAGCTCCTCCGTGATCACATCTCTGGGCGCCATCGTGTCTGCTACGGCAA
 GACAAAGTGTACCGCCAGCAACAAGAACCGGGGCATCATCAAGACCTTCAGCAA
 CGGCTGCGACTACGTGTCCAACAAGGCGTGGACACCGTGTCTGTGGGCAACACC
 CTGTACTACGTGAACAAGCTGGAAGGCAAGAATCTGTACGTGAAGGGCGAGCCC
 ATCATCAACTACTACGACCCTCTGGTGTTCCTCCAGCAACGAGTTCTACGCCAGCA

TCAGCCAAGTGAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCTTCATCCGCAGATCCG
 ATGAGCTGCTGCACAACGTGAACACCGGCAAGAGCACCACAAACATCATGATCA
 CCGCCATCATCATCGTGATCATCGTCGTGCTGCTGTCCCTGATCGCCATCGGACTG
 CTGCTGTACTGCAAGGCCAAGAACACCCCTGTGACACTGAGCAAGGATCAGCTG
 5 AGCGGCATCAACAATATCGCCTTCTCCAAC

SEQ ID NO: 32

Аминокислотная последовательность трансгенного процессированного F_B-белка PCB в
 конформации «до слияния»:

10 MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTQAANNRARRREAPQYMN
 YTINTTKNLNVSISKRRRFLGLLGVGSAIASGMAVSKVLHLEGEVNIKIKNALQLT
 NKAUVSLSNGVSVLTSRVLDLKNYINNQLLPMVNRQSCRIPNIETVIEFQQKNSRLLEI
 TREFSVNAGVTTPLSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSII
 15 KEEVLAYVVLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVS
 FFPQADTCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITS
 LGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNLEGKN
 LYVKGEPIINYDPLVFPSNEFYASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVNTGKSTTNIM
 ITAIIIVIVVLLSLAIGLLLYCKAKNTPVTLISKDQLSGINNIAFSN

20

SEQ ID NO: 33 Ad26RSV020

ATGGAAGTCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACAATCCTGACCGCCGTGA
 CCTTTTGCTTCGCCAGCGGCCAGAACATCACCGAGGAATTCTACCAGAGCACCTG
 25 TAGCGCCGTGTCCAGAGGATATCTGTCTGCCCTGAGAACCGGCTGGTACACCAGC
 GTGATCACCATCGAGCTGAGCAACATCAAAGAAACAAAGTGCAACGGCACCGAC
 ACCAAAGTGAAGCTGATCAAGCAAGAGCTGGACAAGTACAAGAATGCCGTGACC
 GAACTGCAGCTGCTGATGCAGAATACCCAGGCCGCCAACAATCAGGCCAGAGGC
 TCTGGATCTGGCAGAAGCCTGGGATTTCTGCTCGGCGTGGGATCTGCCATTGCCT
 30 CTGGAATGGCCGTGTCTAAGGTGCTGCATCTGGAAGGCGAAGTGAACAAGATCA
 AGAACGCCCTGCAGCTGACCAACAAGGCCGTGGTGTCTCTGTCTAATGGCGTGTC
 CGTGCTGACCAGCAGAGTGCTGGACCTGAAGAACTACATCAACAACCAGCTGCT
 GCCCATGGTCAACCGGCAGAGCTGCAGAATCCCCAACATCGAGACAGTGATCGA
 GTTCCAGCAGAAGAACAGCAGGCTGCTGGAAATCACCCGCGAGTTTTCTGTGAAT

GCCGGCGTGACAACCCCTCTGAGCACCTACATGCTGACCAATAGCGAGCTGCTGA
 GCCTGATCAACGACATGCCCATCACCAACGACCAGAAAAAGCTGATGAGCAGCA
 ACGTGCAGATCGTGCGGCAGCAGAGCTACAGCATCATGAGCATTATCAAAGAAG
 AGGTGCTGGCCTACGTGGTGCAGCTGCCTATCTACGGCGTGATCGATACCCCTTG
 5 CTGGAAGCTGCACACAAGCCCCTGTGCACCACCAATATCAAAGAGGGCAGCAA
 CATCTGCCTGACCAGAACCGATAGAGGCTGGTACTGCGATAATGCCGGCAGCGTC
 AGCTTCTTCCCACAAGCCGATACCTGCAAGGTGCAGAGCAACAGAGTGTTCTGCG
 ACACCATGAACAGCCTGACACTGCCTAGCGAGGTGTCCTGTGCAACACCGACAT
 CTTCAACTCTAAGTACGACTGCAAGATCATGACCTCCAAGACCGACATCAGCTCC
 10 TCCGTGATCACATCTCTGGGCGCCATCGTGTCTGCTACGGCAAGACAAAGTGTA
 CCGCCAGCAACAAGAACCGGGGCATCATCAAGACCTTCAGCAACGGCTGCGACT
 ACGTGTCCAACAAGGGCGTGGACACCGTGTCTGTGGGCAACACCCTGTACTACGT
 GAACAAGCTGGAAGGCAAGAACCTGTACGTGAAGGGCGAGCCCATCATCAACTA
 CTACGACCCTCTGGTGTTCCTCCAGCAACGAGTTCGATGCCAGCATCAGCCAAGTG
 15 AACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCTTCATCAGACGCTCCGATGAGCTGCTGC
 ACAACGTGAACACCGGCAAGAGCACCACAAACATCATGATCACCGCCATCATCA
 TCGTGATCATCGTCGTGCTGCTGTCCCTGATCGCCATCGGACTGCTGCTGTACTGC
 AAGGCCAAGAACCCCCTGTGACACTGAGCAAGGATCAGCTGAGCGGCATCAAC
 AATATCGCCTTCTCCAAC

20

SEQ ID NO: 34 белок, кодируемый Ad26RSV020 (одноцепочечный)

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSRGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNIKETKCNGTDTKVLIKQELDKYKNAVTELQLLMQNTQAANNQARGSGSGRSL
 25 GFLLGVGSAIASGMAVSKVLHLEGEVKNKINALQLTNKAVVSLSNGVSVLTSRVLDL
 KNYINNQLLPMVNRQSCRIPNIETVIEFQQKNSRLLEITREFSVNAGVTTPPLSTYMLTN
 SELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPIYGVIDTPC
 WKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTM
 NSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRG
 30 IIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTRYVVKLEGKNLYVKGEPIINYDPLVFPSNEF
 DASISQVNEKINQSLAFIRRSDELLHNVNTGKSTTNIMITAIIIVIIIVVLLSLIAIGLLLYC
 KAKNTPVTLSKDQLSGINNIAFSN

Справочная литература

Gilman et al., Sci Immunol. 1(6): eaaj1879 (2016)

Jones et al., Plos Pathogens: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007944> (July 15, 2019)

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

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

Letarov et al., Biochemistry Moscow 64: 817-823 (1993)

McLellan, et al. Science 342, 592-598 (2013)

McLellan, et al. Nat Struct Mol Biol 17, 248-250 (2010)

McLellan, et al. Science 340, 1113-1117 (2013)

10 Mousa et al., Nat Microbiol: 2: 16271. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.271 (2017)

S-Guthe et al., J. Mol. Biol. 337: 905-915. (2004)

Swanson, et al. (2011) Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jun 7;108(23):9619-24.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

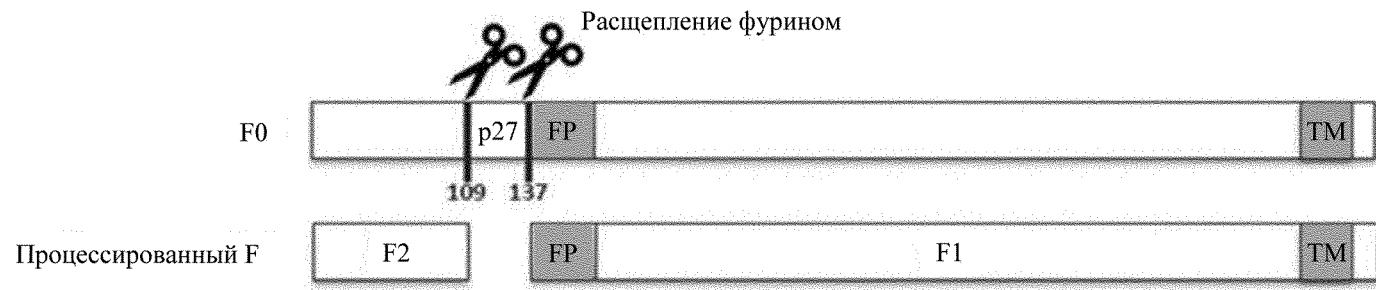
1. Стабилизированный белок слияния (F-белок) респираторно-синцитиального вируса (РСВ) в конформации «до слияния», содержащий домены F1 и F2, содержащие аминокислотную последовательность доменов F1 и F2 F-белка РСВ штамма В, причем аминокислотный остаток в положении 101 представляет собой Q, аминокислотный остаток в положении 152 представляет собой M, аминокислотный остаток в положении 215 представляет собой P, аминокислотный остаток в положении 486 представляет собой N.
2. Белок по п. 1, в котором аминокислотный остаток в положении 489 представляет собой Y.
3. Белок по п. 1 или 2, в котором аминокислотный остаток в положении 203 представляет собой I.
4. Белок по пп. 1, 2 или 3, в котором аминокислотный остаток в положении 226 представляет собой M.
5. Белок по пп. 1, 2 или 3, в котором аминокислотный остаток в положении 101 представляет собой Q, аминокислотный остаток в положении 152 представляет собой M, аминокислотный остаток в положении 203 представляет собой I, аминокислотный остаток в положении 215 представляет собой P, аминокислотный остаток в положении 226 представляет собой M, а аминокислотный остаток в положении 486 представляет собой N.
6. Белок по п. 3, в котором аминокислотный остаток в положении 101 представляет собой Q, аминокислотный остаток в положении 152 представляет собой M, аминокислотный остаток в положении 203 представляет собой I, аминокислотный остаток в положении 215 представляет собой P, аминокислота остаток в положении 486 представляет собой N, а аминокислотный остаток в положении 489 представляет собой Y.
7. Белок по любому из предшествующих пунктов, в котором аминокислотный остаток в положении 172 представляет собой Q, а аминокислотный остаток в положении 172 представляет собой L.

8. Белок по любому из предшествующих пунктов, в котором аминокислотный остаток в положении 191 представляет собой R, аминокислотный остаток в положении 206 представляет собой M, а аминокислотный остаток в положении 209 представляет собой R.
- 5 9. Белок по любому из предшествующих пунктов, в котором сайты расщепления фурином были удалены.
10. Белок по любому из предшествующих пунктов, содержащий усеченный домен F1.
- 10 11. Белок по п. 10, в котором трансмембранный и цитоплазматический домены удалены, причем указанные трансмембранный и цитоплазматический домены содержат аминокислоты с 514 по 574.
12. Белок по п. 10 или 11, в котором гетерологичный домен тримеризации связан с усеченным доменом F1.
- 15 13. Белок по п. 12, в котором гетерологичный домен тримеризации представляет собой домен фолдон, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.
- 20 14. Белок по любому из предшествующих пунктов, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 34, или его фрагменты.
15. Белок по любому из предшествующих пунктов, в котором нет сигнального пептида, пептида p27 или tag-последовательности.
16. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок по любому из предшествующих пп. 1–15.
- 25 17. Нуклеиновая кислота по п. 16, причем молекула нуклеиновой кислоты представляет собой ДНК или РНК.

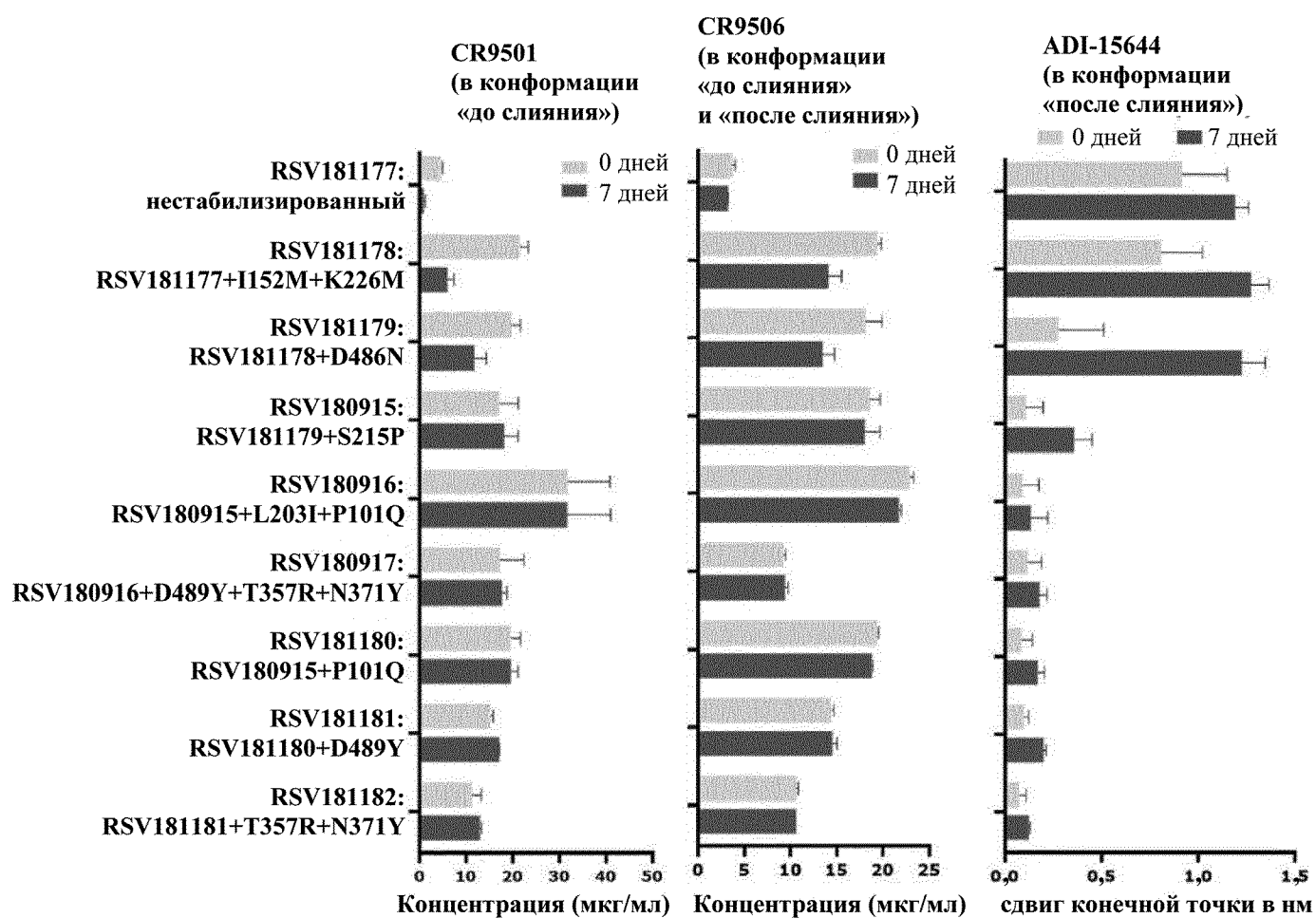
18. Нуклеиновая кислота по п. 16 или 17, кодирующая белок, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 34, или его фрагменты.
- 5 19. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по пп. 16, 17 или 18.
20. Вектор по п. 19, представляющий собой рекомбинантный аденовирусный вектор человека.
21. Вектор по п. 20, причем аденовирусный вектор представляет собой неспособный к репликации аденовирусный вектор Ad26 с удаленной областью E1 и областью E3.
- 10 22. Композиция, содержащая белок по любому из пп. 1–15, нуклеиновую кислоту по пп. 16, 17 или 18 и/или вектор по пп. 19, 20 или 21.
23. Композиция, содержащая белок по любому из пп. 1–15 и вектор по пп. 19, 20 или 21.
- 15 24. Вакцина против РСВ, содержащая композицию по п. 22 или 23.
25. Способ вакцинации субъекта от РСВ, включающий введение субъекту вакцины по п. 24.
26. Способ предотвращения инфекции и/или репликации РСВ у субъекта, включающий введение субъекту вакцины по п. 24.
- 20 27. Способ по п. 26, в котором предотвращенная инфекция и/или репликация РСВ характеризуются предотвращением или уменьшением проявления подтвержденного полимеразной цепной реакцией с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) РСВ-опосредованного заболевания нижних дыхательных путей (LRTD).

28. Способ по п. 26, в котором предотвращенная инфекция и/или репликация РСВ характеризуются отсутствием или снижением вирусной нагрузки РСВ в носовых ходах и/или легких субъекта.
- 5 29. Способ по п. 26, в котором предотвращенная инфекция и/или репликация РСВ характеризуются отсутствием или ослаблением клинических симптомов РСВ у субъекта после воздействия на него РСВ.
30. Выделенная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по пп. 16, 17 или 18.
- 10 31. Выделенная клетка-хозяин, содержащая рекомбинантный аденовирус человека 26-го серотипа, содержащий нуклеиновую кислоту по пп. 16, 17 или 18.

Фиг. 1

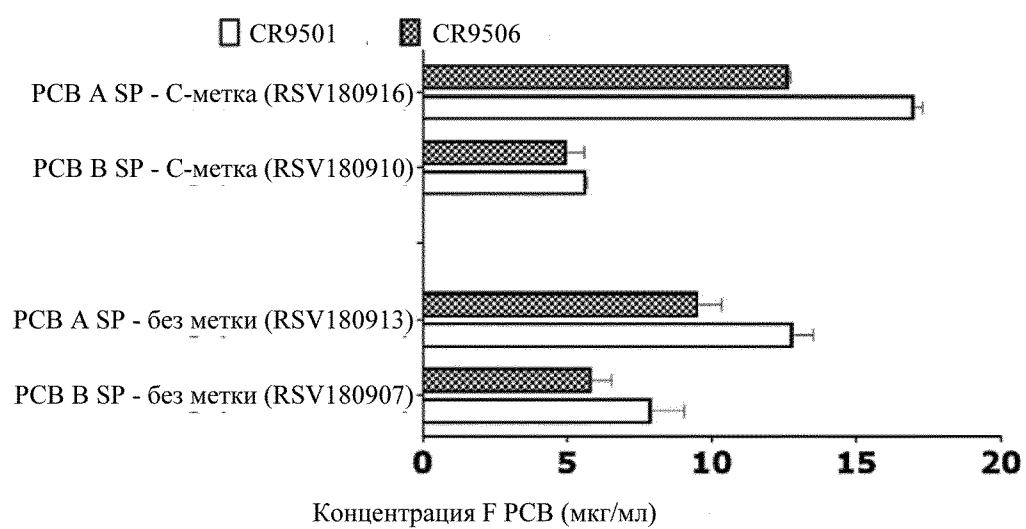


A



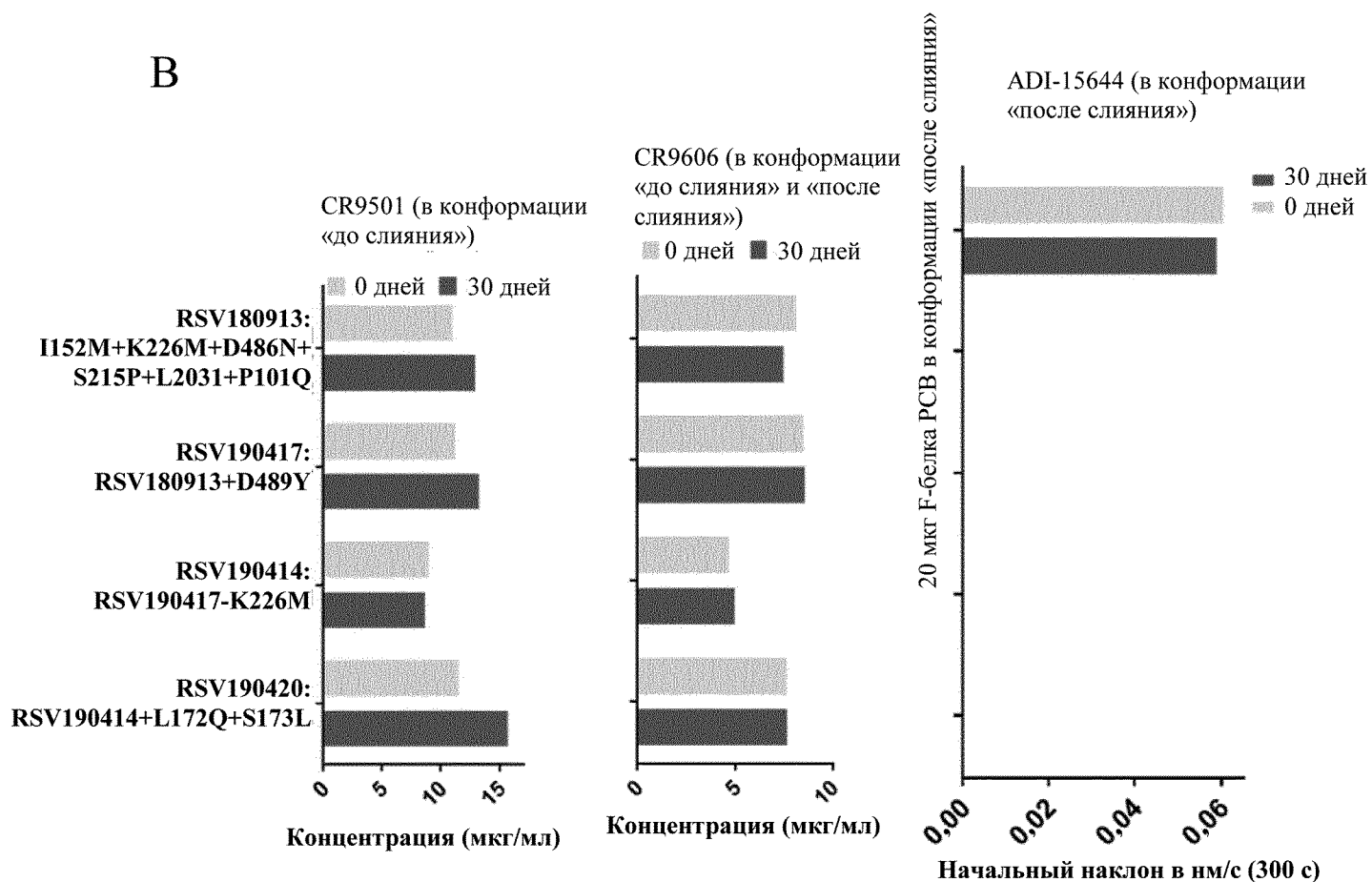
Фиг. 2

Б

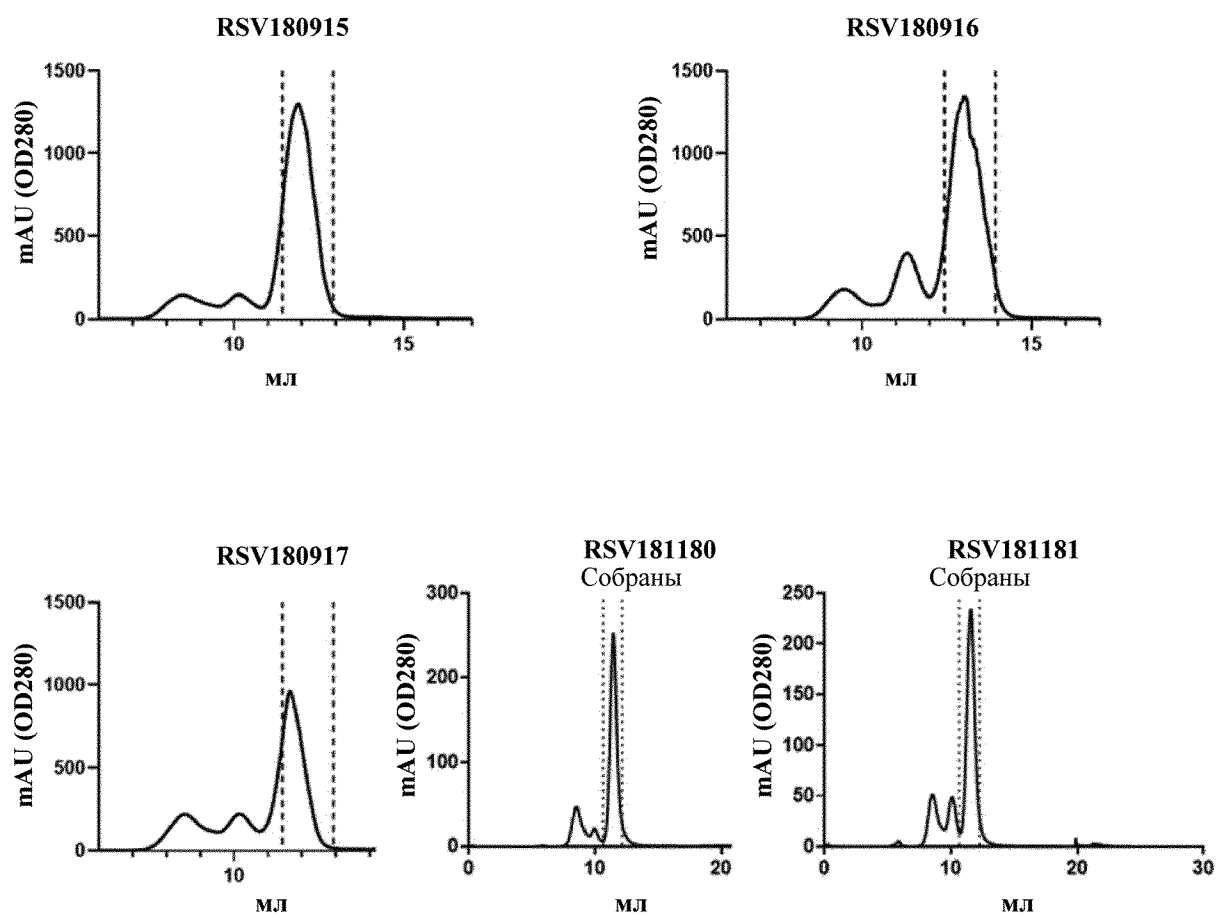


Фиг. 2 (продолжение)

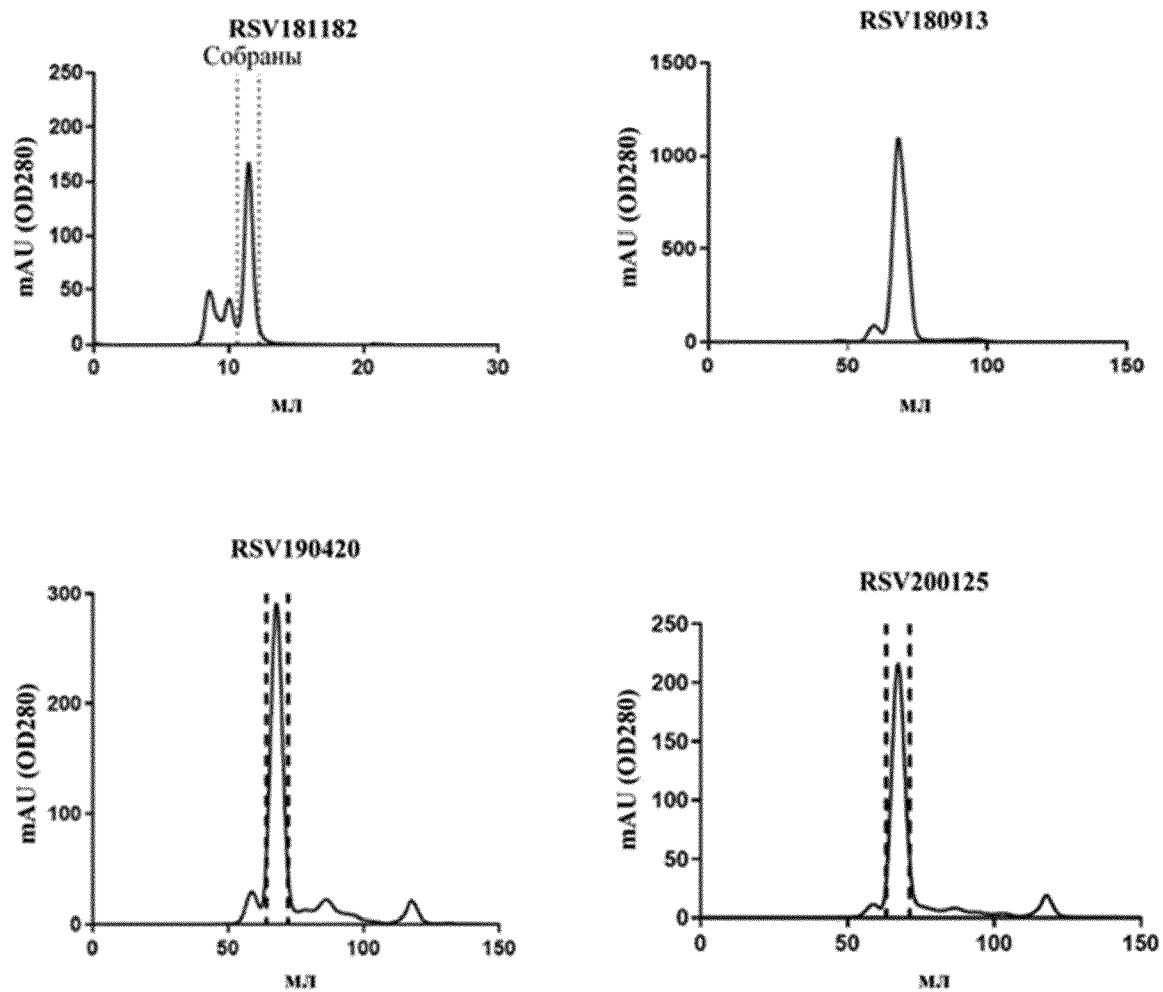
В



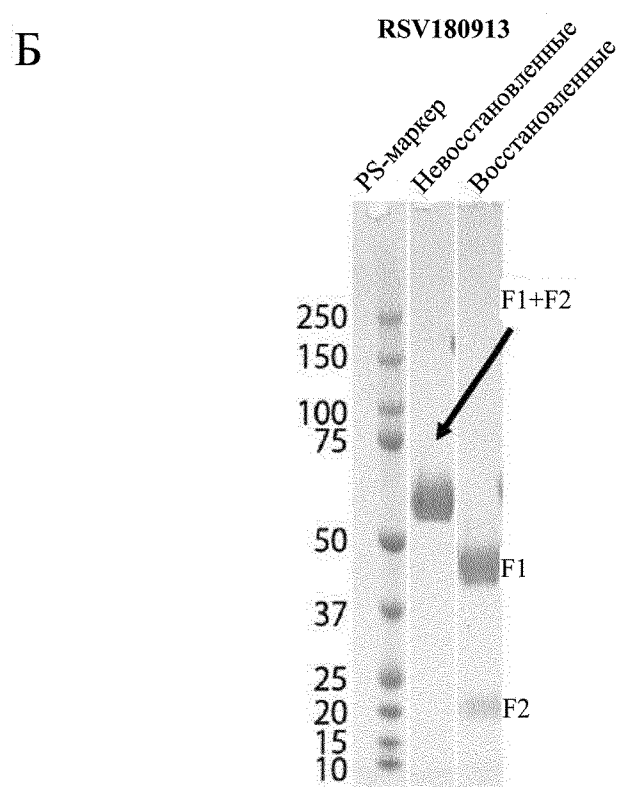
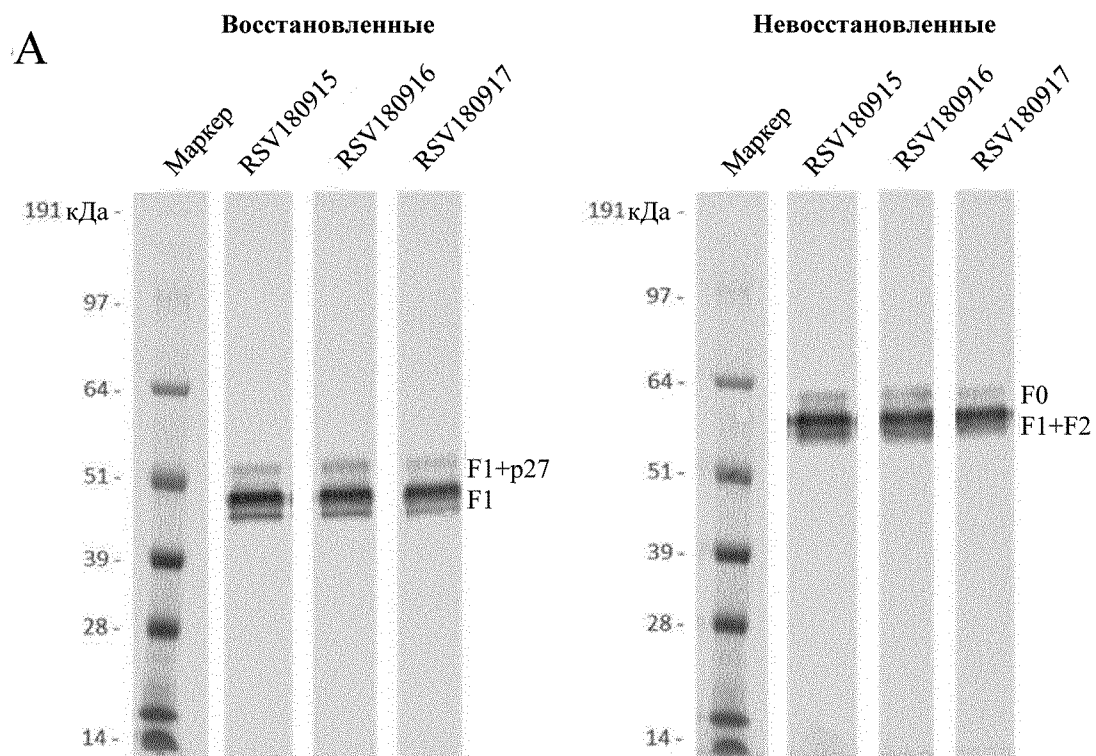
Фиг. 2 (продолжение)



Фиг. 3

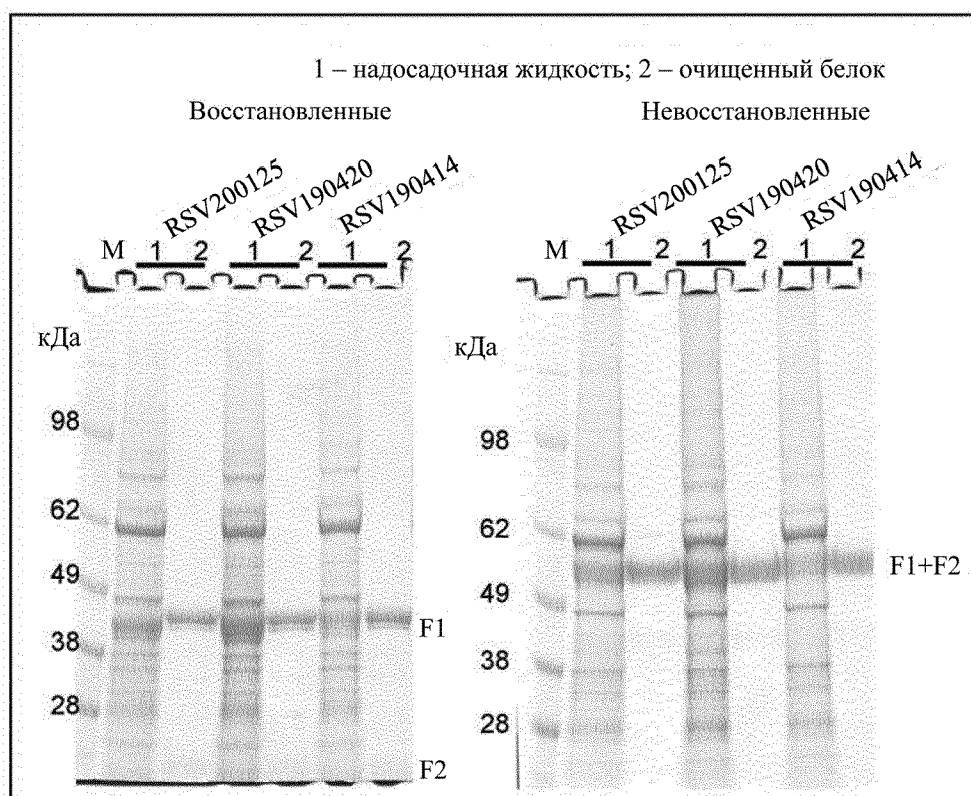


Фиг. 3 (продолжение)

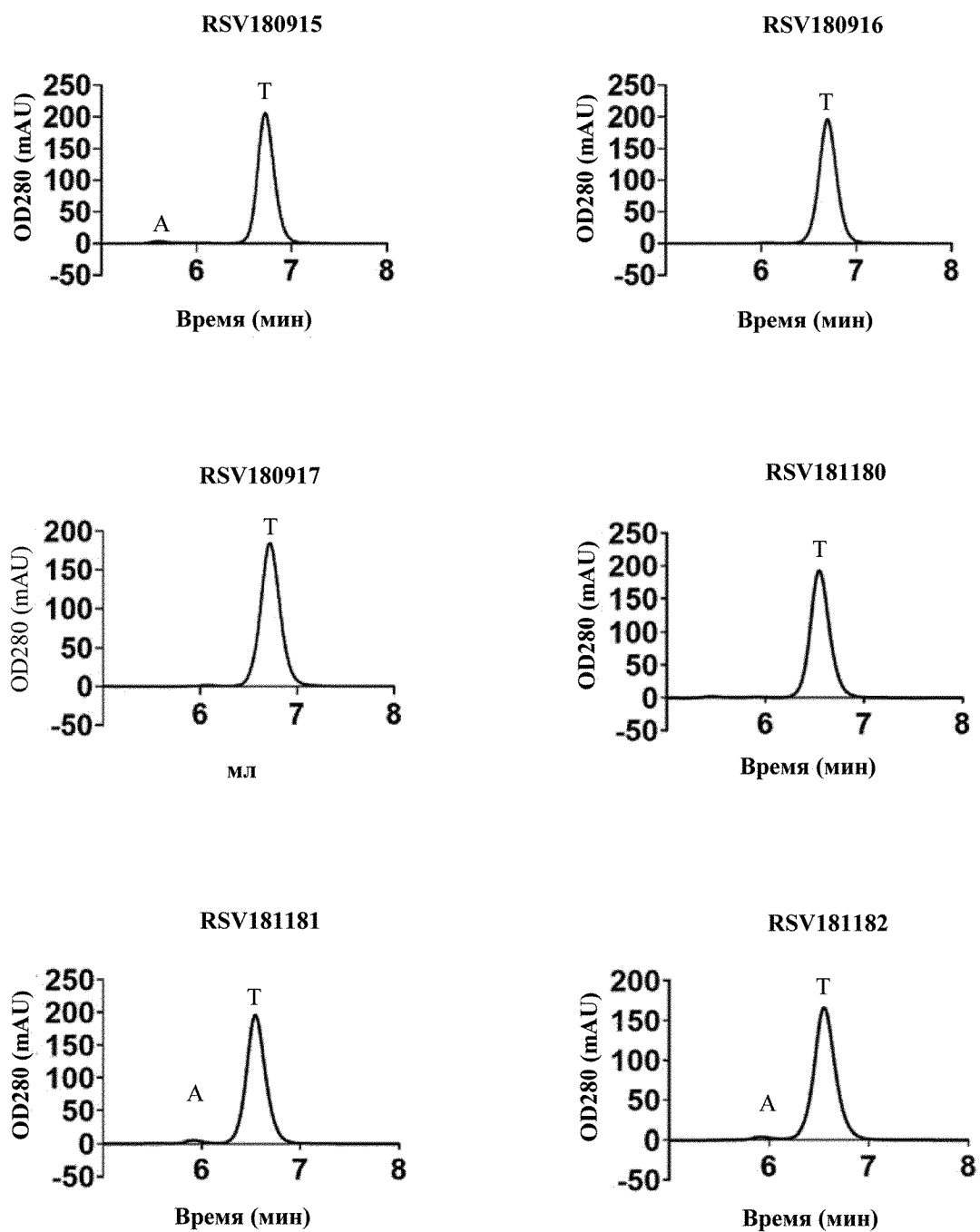


Фиг. 4

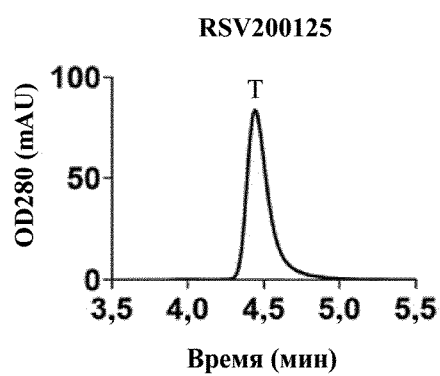
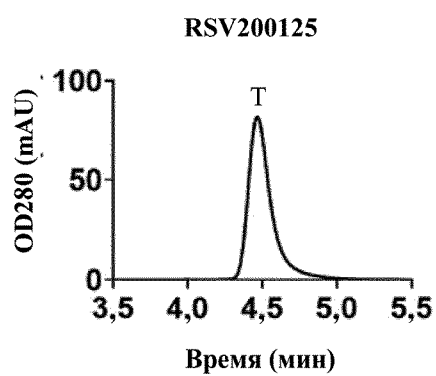
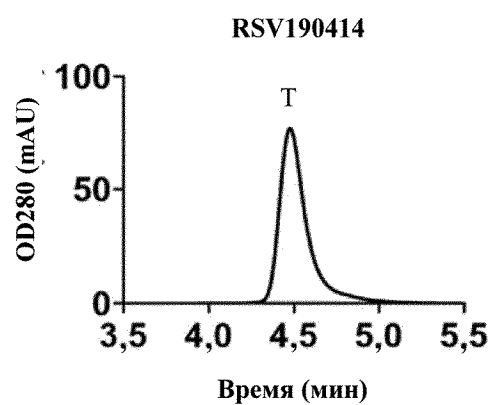
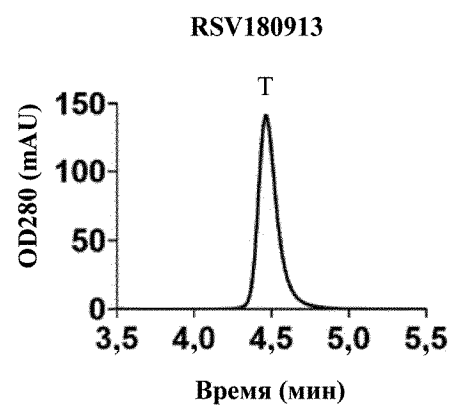
В



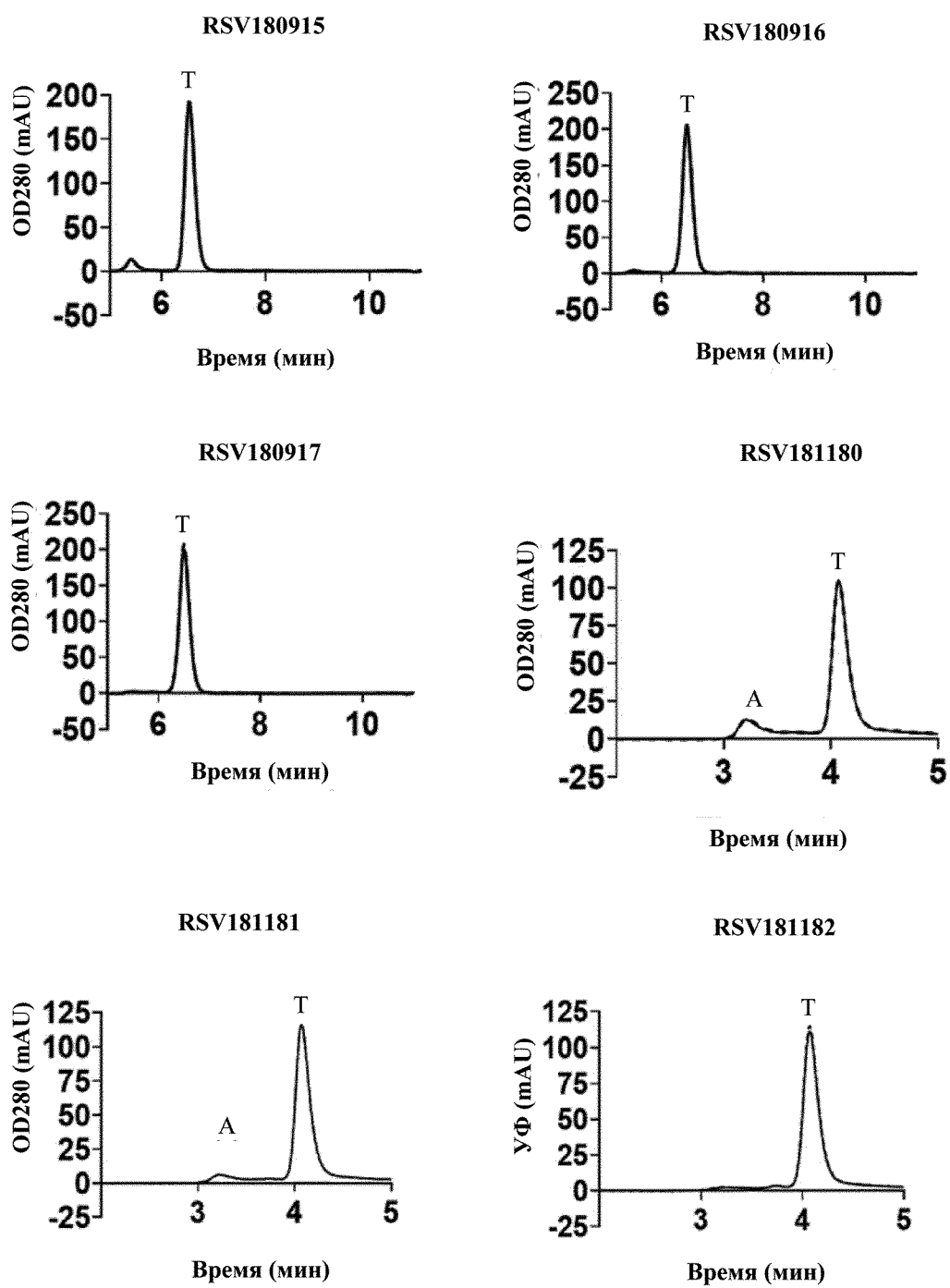
Фиг. 4 (продолжение)



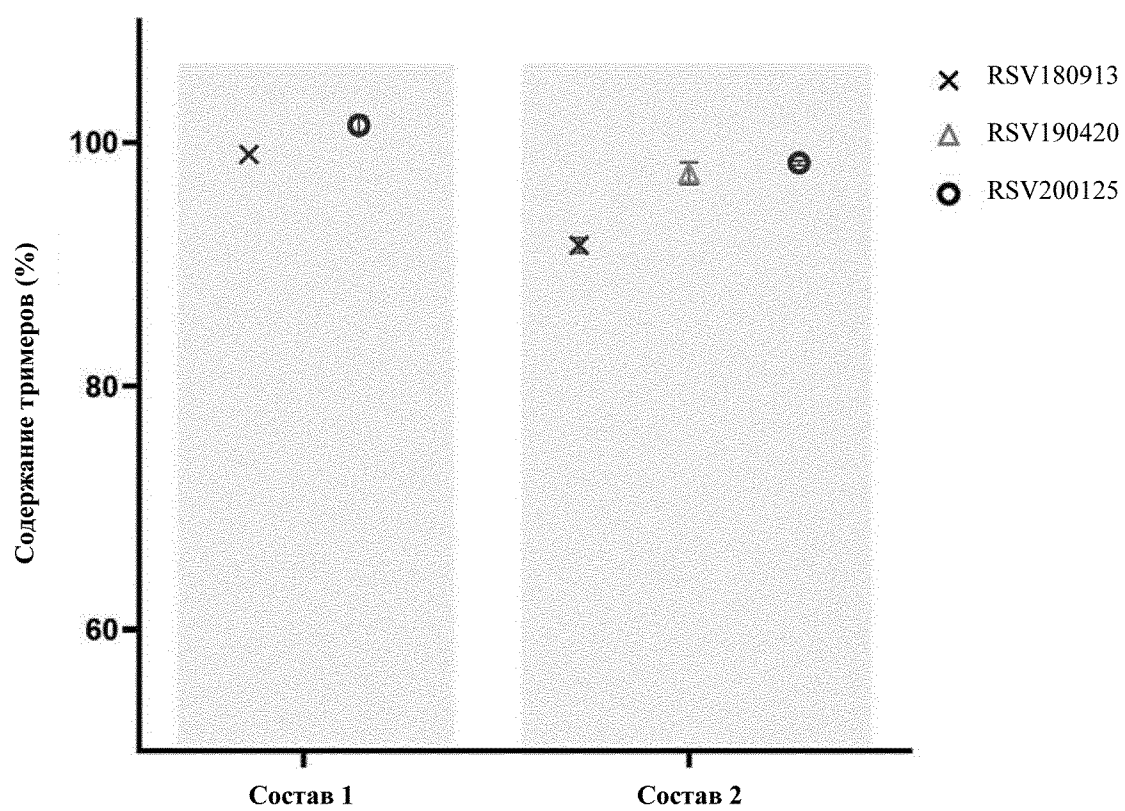
Фиг. 5



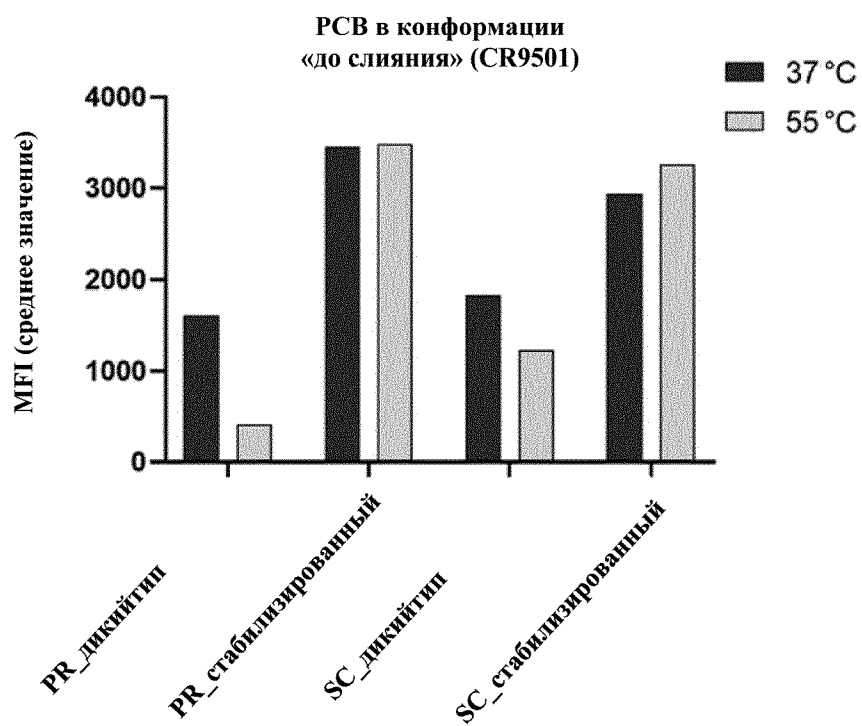
Фиг. 5 (продолжение)



Фиг. 6

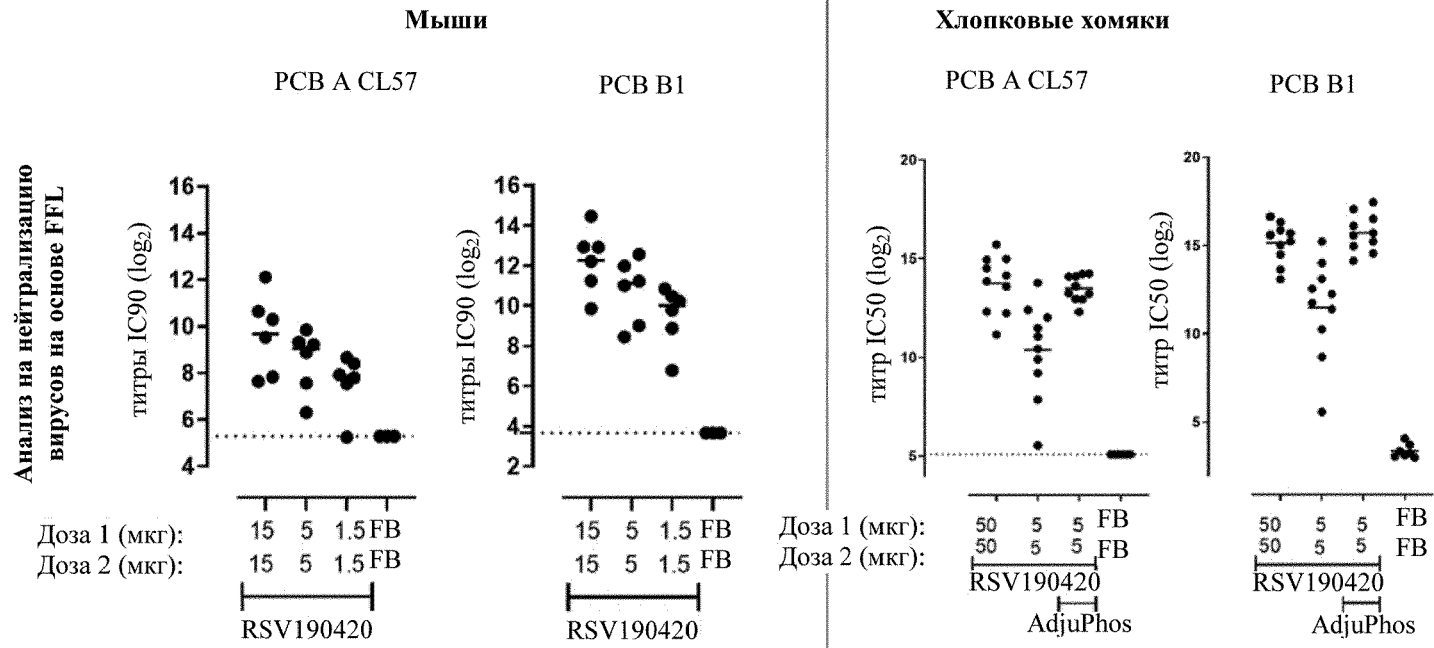


Фиг. 7

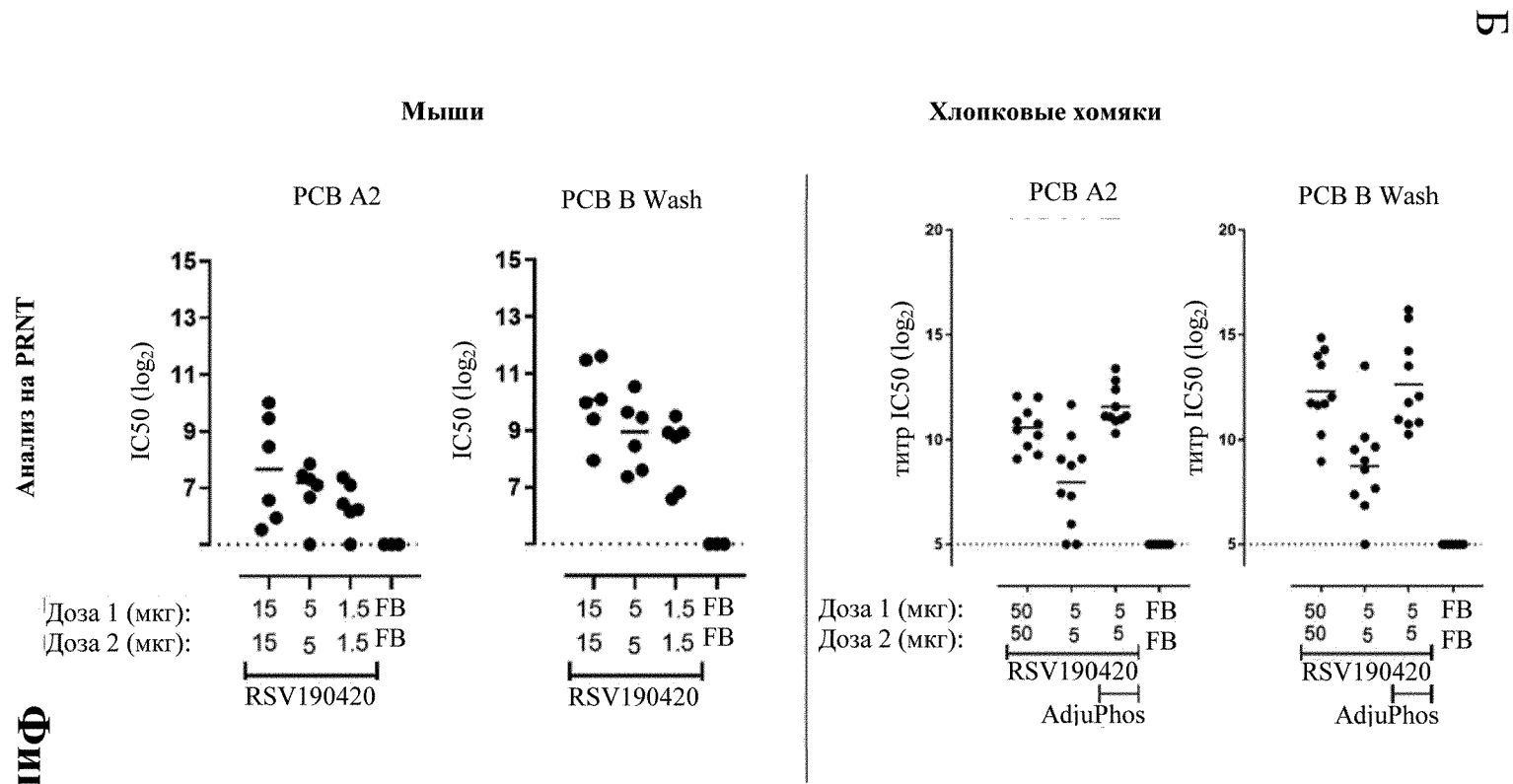


Фиг. 8

Фиг. 9

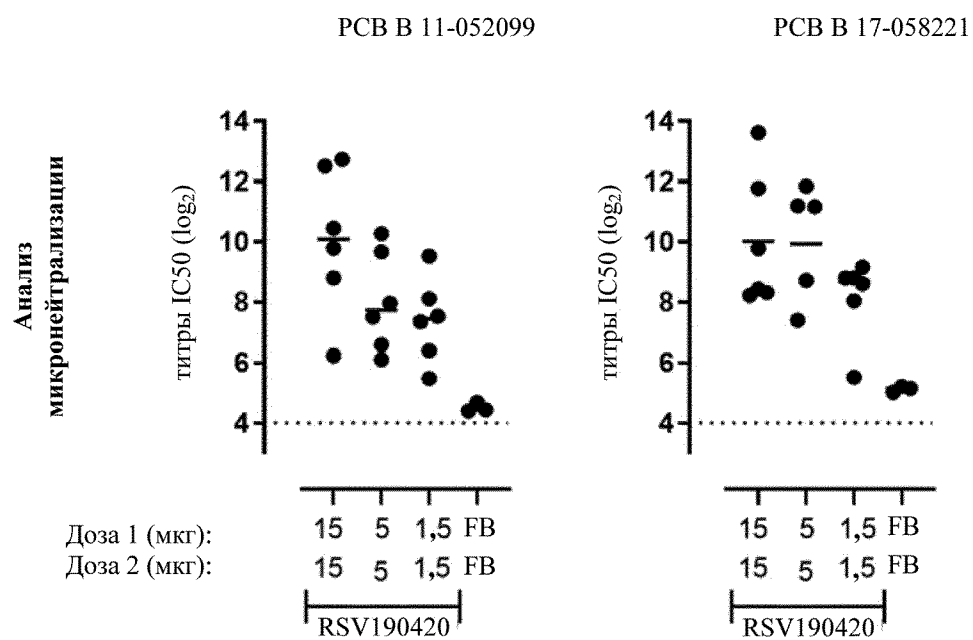


Фиг. 9 (продолжение)



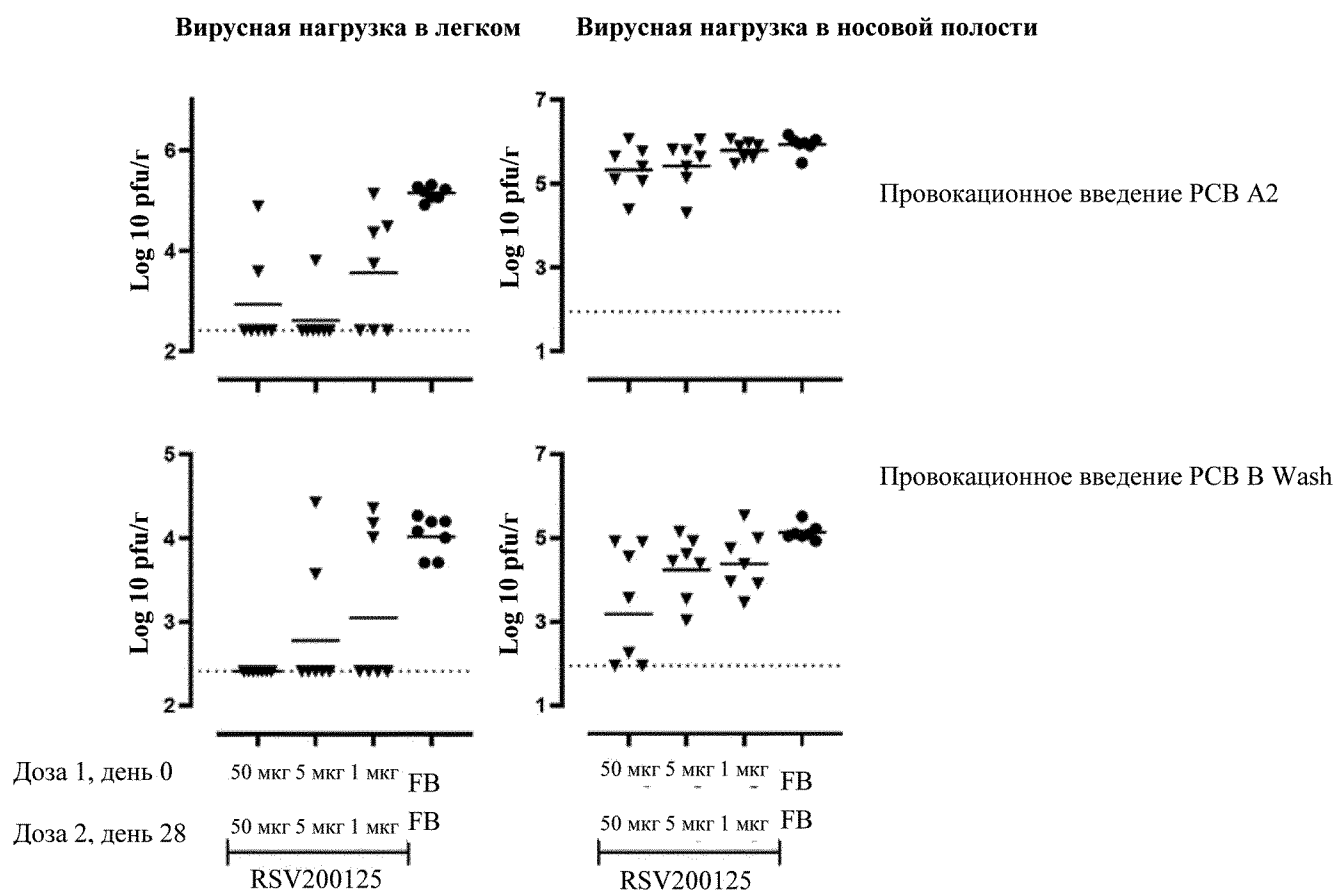
В

Мыши



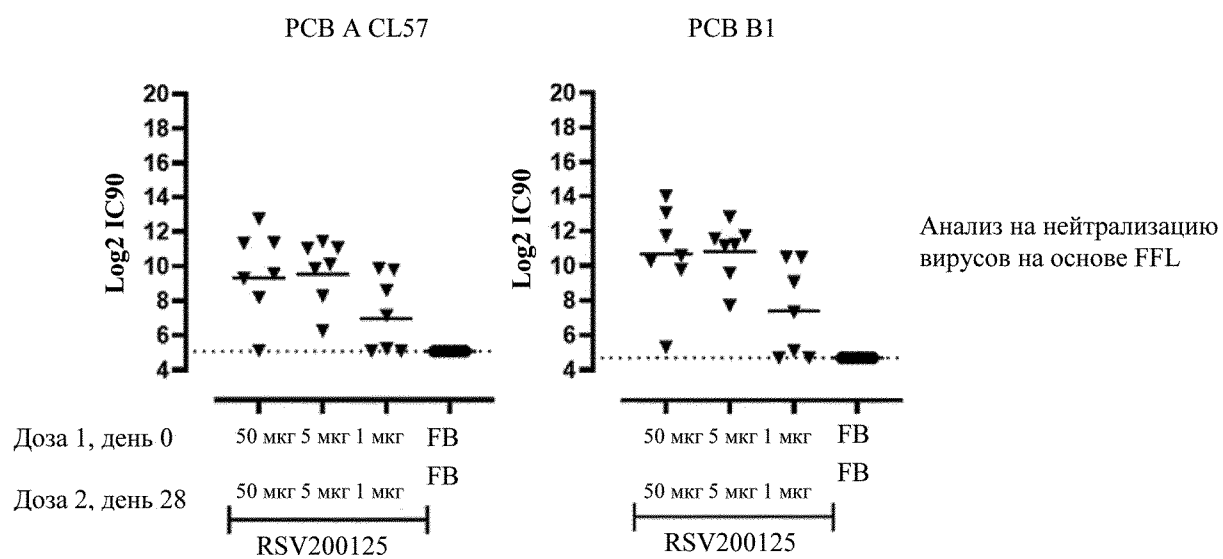
Фиг. 9 (продолжение)

A

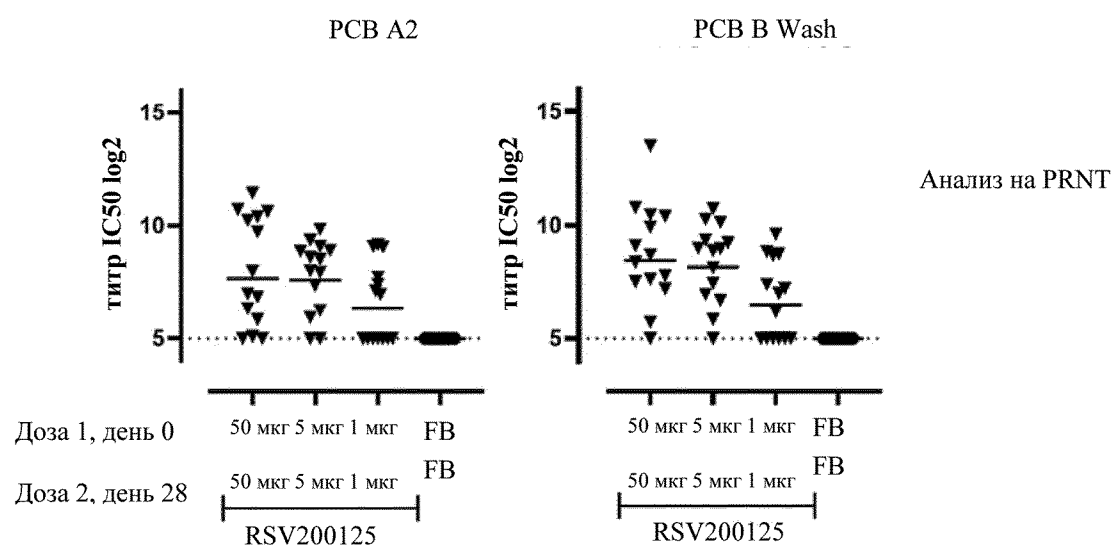


Фиг. 10

Б



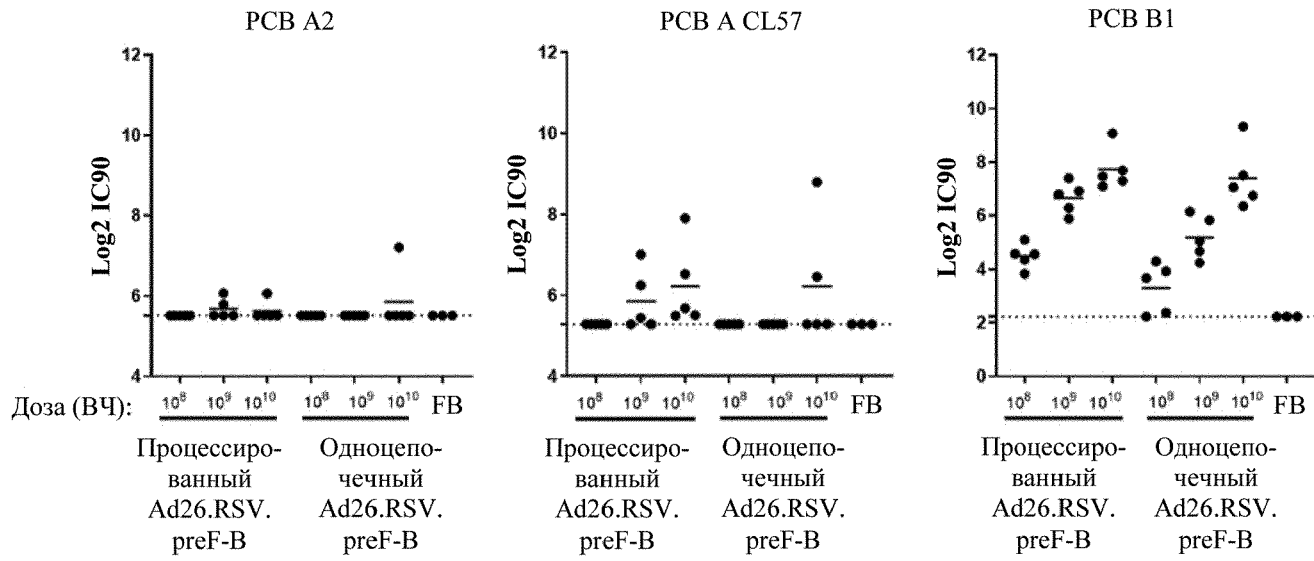
В



Фиг. 10 (продолжение)

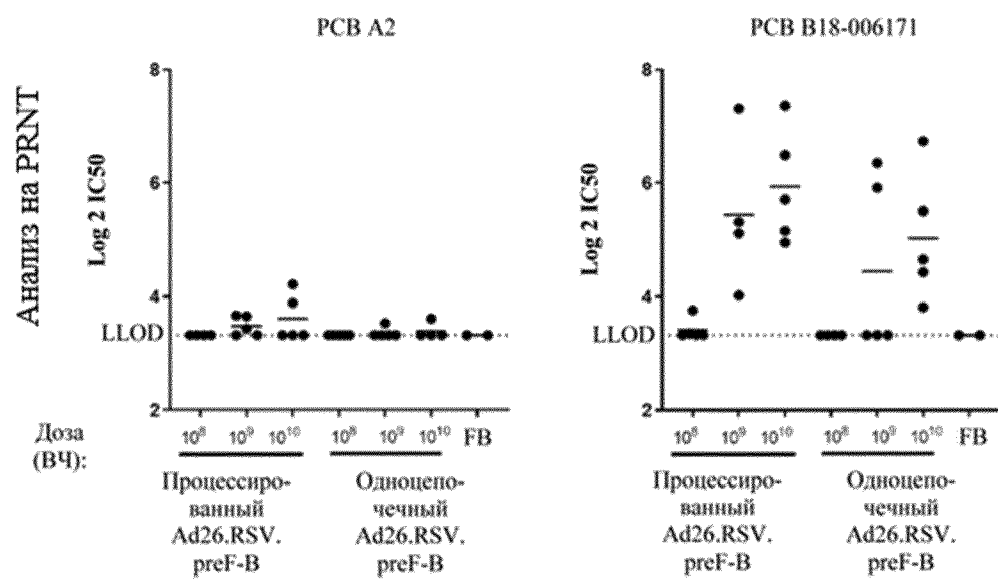
Фиг. 11

Анализ на нейтрализацию
вирусов на основе FFL

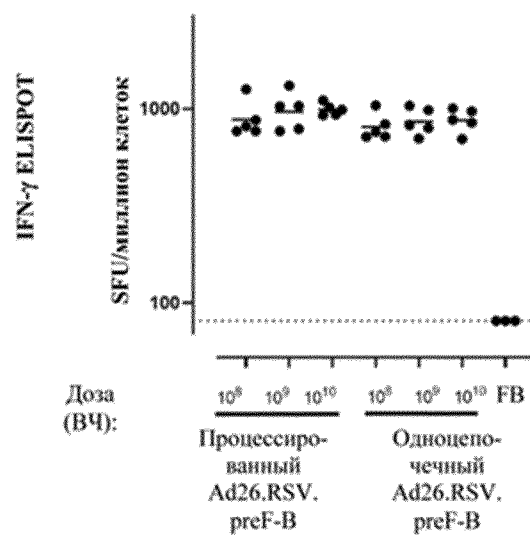


A

Б

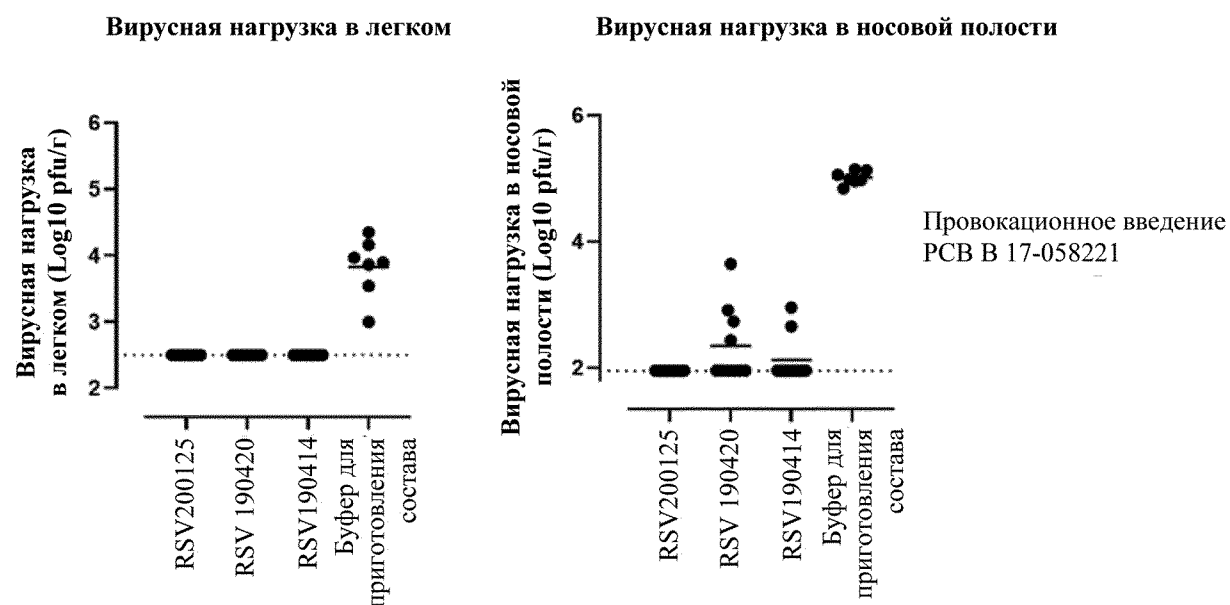


В

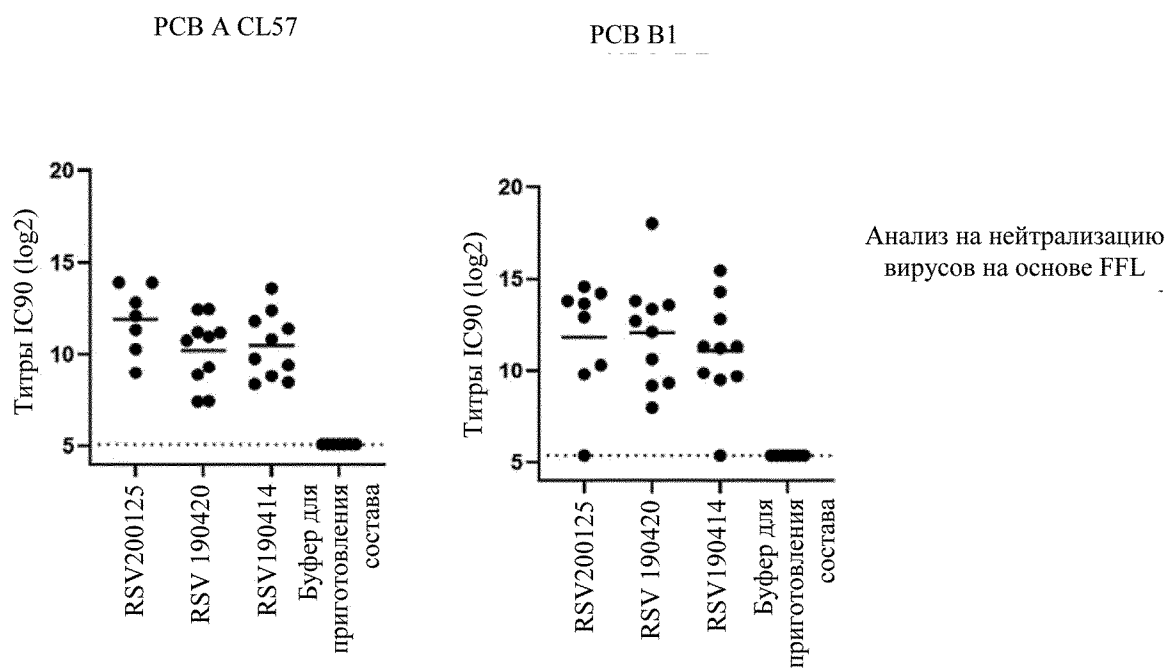


Фиг. 11 (продолжение)

А

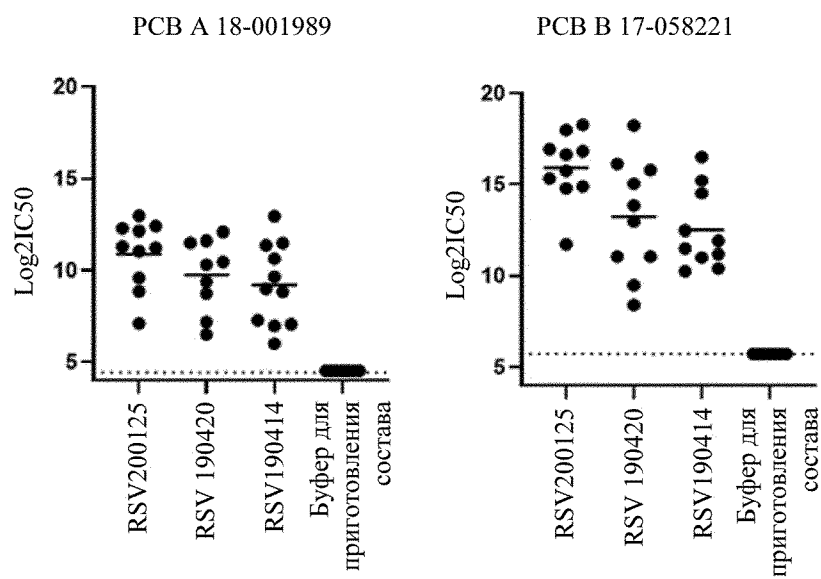


Б



Фиг. 12

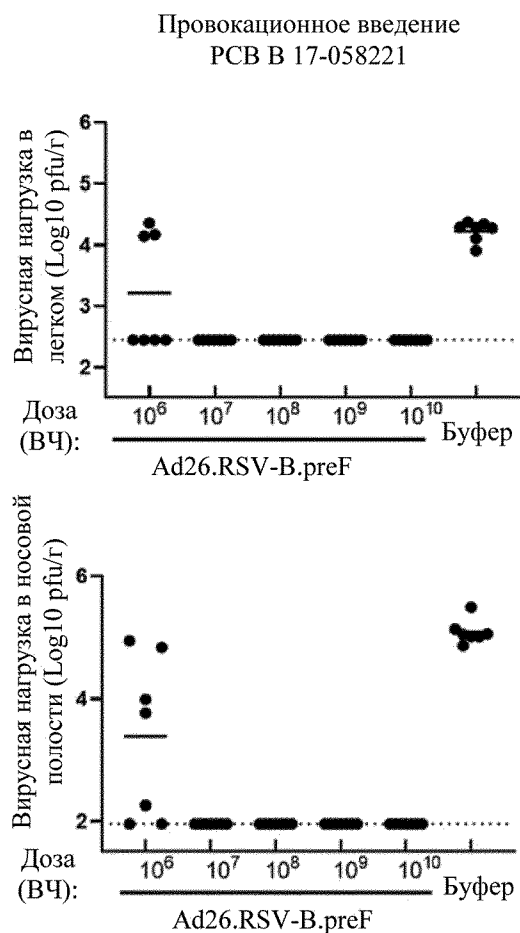
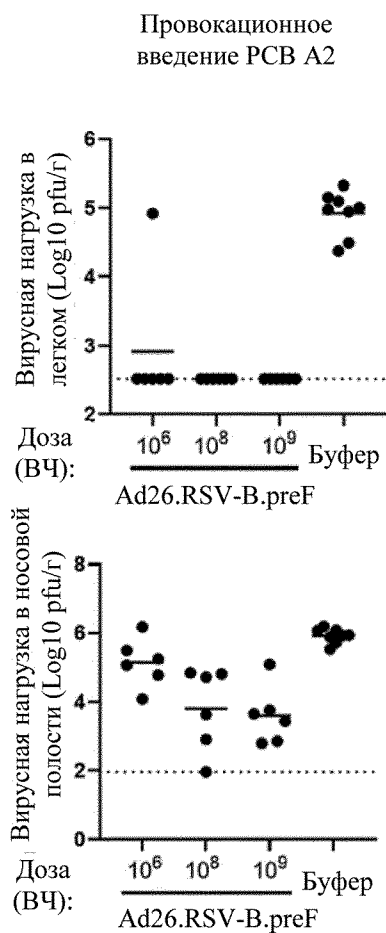
В



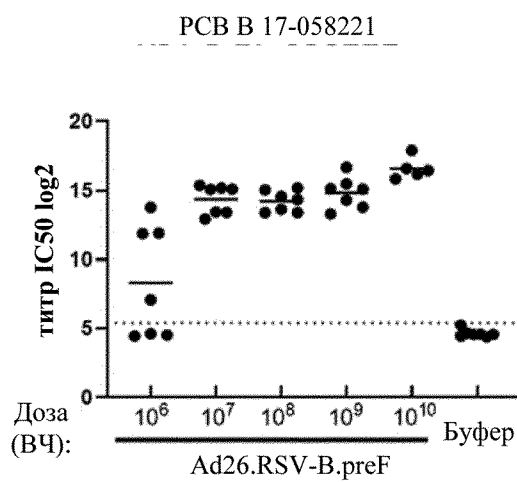
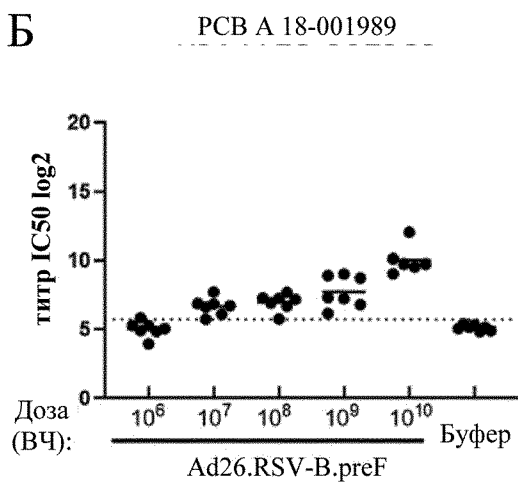
Анализ
микронейтрализации

Фиг. 12 (продолжение)

А

Вирусная нагрузка
в легкомВирусная нагрузка
в носовой полости

Б

Анализ
микронейтрализации

Фиг. 13