



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2016.04.29

(21) Номер заявки
201270063

(22) Дата подачи заявки
2010.06.24

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

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИГЕНЫ РСВ

(31) **61/219,964; 61/334,568**

(32) **2009.06.24; 2010.05.13**

(33) **US**

(43) **2012.07.30**

(86) **PCT/EP2010/059008**

(87) **WO 2010/149745 2010.12.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ГЛЭКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛЗ С.А. (ВЕ)**

(72) Изобретатель:
**Боду Ги Жан Мари Фернан Пьер (ВЕ),
Бле Норман, Сир Соня Л., Ро Патрик
(СА), Рюэль Жан Луи (ВЕ)**

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

(56) MARTÍN DIANA ET AL.: "Sequence elements of the fusion peptide of human respiratory syncytial virus fusion protein required for activity", June 2006 (2006-06), THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY JUN 2006 LNKD-PUBMED:16690930, vol. 87, NR. PT 6, page(s) 1649-1658, XP002600413, ISSN: 0022-1317, abstract; introduction; page 87; fig. 1

GONZALEZ-REYES L. ET AL.: "Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion", 14 August 2001 (2001-08-14), PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 14 AUG. 2001 LNKD-PUBMED:11493675, vol. 98, NR. 17, page(s) 9859-9864, XP002600414, ISSN: 0027-8424, abstract; page 9862

YIN HSIEN-SHENG ET AL.: "Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation", 5 January 2006 (2006-01-05), NATURE 5 JAN. 2006, LNKD- PUBMED:16397490, vol. 439, NR. 7072, page(s) 38-44, XP002600415, ISSN: 1476-4687, abstract; introduction; page 38; fig. 1

SCHMIDT A.C. ET AL.: "Mucosal immunization of Rhesus monkeys against respiratory syncytial virus

subgroups A and B and human parainfluenza virus type 3 by using a live cDNA-derived vaccine based on a host range-attenuated bovine parainfluenza virus type 3 vector backbone", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US LNKD- DOI:10.1128/JVI.76.23.12355-12359.2002, vol. 76, no. 3, 1 February 2002 (2002-02-01), pages 1089-1099, XP002978183, ISSN: 0022-538X, the whole document

HUANG YAN ET AL.: "Modulation of protective immunity, eosinophilia, and cytokine responses by selective mutagenesis of a recombinant G protein vaccine against respiratory syncytial virus", April 2005 (2005-04), JOURNAL OF VIROLOGY APR/ 2005 LNKD-PUBMED:15767454, vol. 79, NR. 7, page(s) 4527-4532, XP002600416, ISSN: 0022-538X, the whole document

TANG RODERICK S. ET AL.: "Parainfluenza virus type 3 expressing the native or soluble fusion (F) Protein of Respiratory Syncytial Virus (RSV) confers protection from RSV infection in African green monkeys", October 2004 (2004-10), JOURNAL OF VIROLOGY OCT. 2004 LNKD-PUBMED:15452239, vol. 78, NR. 20, page(s) 11198-11207, XP002600417, ISSN: 0022-538X, the whole document

VALARCHER J.-F. ET AL.: "Bovine respiratory syncytial virus lacking the virokinin or with a mutation in furin cleavage site RA(R/K)R109 induces less pulmonary inflammation without impeding the induction of protective immunity in calves", June 2006 (2006-06), THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY JUN. 2006, LNKD-PUBMED:16690931, vol. 87, NR. PT 6, page(s) 1659-1667, XP002600418, ISSN: 0022-1317, abstract; fig. 1

WO-A1-2009079796

WO-A1-0242326

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S. ET AL.: "Immunopathology of RSV infection: prospects for developing vaccines without this complication", REVIEWS IN MEDICAL VIROLOGY, CHICHESTER, GB LNKD-DOI:10.1002/RMV.518, vol. 17, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 5-34, XP002510797, ISSN: 1052-9276, [retrieved on 2006-09-27], the whole document

OLSON MATTHEW R. ET AL.: "Pulmonary immunity and immunopathology: lessons from respiratory syncytial virus", EXPERT REVIEW OF VACCINES, FUTURE DRUGS, LONDON, GB, vol. 7, no. 8, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 1239-1255, XP009138398, ISSN: 1476-0584, the whole document

(57) Изобретение относится к рекомбинантным антигенам респираторно-синцитиального вируса (РСВ) и способам их получения и применения, включая иммуногенные композиции (например, вакцины) для лечения и/или профилактики РСВ-инфекции.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По этой заявке испрашивается приоритет по более ранним датам подачи временных предварительных заявок на выдачу патента США 61/334568, поданной 13 мая 2010 г., и 61/219964, поданной 24 июня 2009 г., описания которых включены в настоящую публикацию в виде ссылки.

Уведомление об авторском праве согласно 37 C.F.R. § 1.71 (E)

Часть описания патентного документа содержит материал, который подлежит охране авторского права. Обладатель авторского права не возражает против факсимильного воспроизведения патентного документа или описания патента кем-либо, поскольку эти документы фигурируют в файлах или регистрах бюро по регистрации патентов и товарных знаков, однако во всех без исключения остальных отношениях все авторские права сохраняются.

Уровень техники

Настоящее изобретение относится к области иммунологии. Более конкретно настоящее изобретение относится к композициям и способам индукции иммунного ответа, специфичного для респираторно-синцициального вируса (РСВ).

Респираторно-синцициальный вирус человека (РСВ) во всем мире является наиболее распространенной причиной инфекций нижних дыхательных путей (LRI) у маленьких детей в возрасте менее 6 месяцев и недоношенных детей, рожденных на сроке меньше или равном 35 неделям беременности. Спектр РСВ-заболеваний включает широкий ряд респираторных симптомов от ринита и отита до пневмонии и бронхоолита, при этом последние два заболевания ассоциированы с высокой заболеваемостью и смертностью. Человек является единственным известным источником РСВ. Распространение вируса из инфицированного носового секрета происходит через крупные выдыхаемые капельки, так что для передачи требуется близкий контакт с инфицированным человеком или загрязненной поверхностью. РСВ может персистировать в течение нескольких часов на игрушках или других предметах, что объясняет высокую частоту нозокомиальных РСВ-инфекций, особенно в педиатрических отделениях.

Ежегодные показатели инфекции по всему миру и смертности в случае РСВ оценивают на уровне 64 млн и 160000 соответственно. Только в США, судя по оценкам, РСВ ответственен за 18000-75000 случаев госпитализации и 90-1900 смертей ежегодно. Убедительно подтверждено документальными доказательствами, что в умеренном климате РСВ является причиной эпидемий острых LRI в ранний зимний период, включая бронхоолит и пневмонию. В США почти все дети по достижении двухлетнего возраста инфицированы РСВ. Коэффициент заболеваемости РСВ-ассоциированными LRI у здоровых в других отношениях детей, как было рассчитано, составляет 37 на 1000 детей в год в первые два года жизни (45 на 1000 детей в год у детей в возрасте менее 6 месяцев), и риск госпитализации составляет 6 на 1000 детей в год (на 1000 детей в год в первые шесть месяцев жизни). Частота выше у детей с заболеванием сердца и легких и у недоношенных детей, которые составляют почти половину пациентов, поступающих в лечебные заведения в связи с РСВ в США. Среди детей, которые перенесли более тяжелое LRI, вызванное РСВ, впоследствии наблюдают повышенную частоту заболевания детской астмы. Такие исследования свидетельствуют о повсеместной необходимости в РСВ-вакцинах, а также их применении в промышленно развитых странах, где затраты на уход за пациентами с тяжелыми LRI и их осложнениями являются значительными. РСВ также все больше и больше признают в качестве важной причины заболеваемости гриппоподобными заболеваниями у пожилых людей.

Были предприняты различные подходы при попытках получить безопасную и эффективную РСВ-вакцину, чтобы вызвать продолжительные и защитные иммунные ответы в популяциях здоровых людей и подвергаемых риску популяциях. Однако ни один из оцениваемых до настоящего времени кандидатов не зарекомендовал себя в качестве безопасной и эффективной вакцины для целей профилактики РСВ-инфекции и/или ослабления или профилактики РСВ-заболевания, включая инфекции нижних дыхательных путей (LRI).

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным антигенам респираторно-синцициального вируса (РСВ). Более конкретно, настоящее описание относится к антигенам, включая рекомбинантный F-белок, который был модифицирован для стабилизации тримерной конформации, которую белок имеет перед слиянием. Описанные рекомбинантные антигены проявляют превосходную иммуногенность и особенно предпочтительно применимы в качестве компонентов иммуногенных композиций (например, вакцин) для защиты от РСВ-инфекции и/или заболевания. Также описаны нуклеиновые кислоты, которые кодируют рекомбинантные антигены, иммуногенные композиции, содержащие антигены, и способ получения и применения антигенов.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1А является схематичной иллюстрацией отличительных структурных признаков F-белка РСВ. Фиг. 1В является схематичной иллюстрацией примеров антигенов F РСВ перед слиянием (PreF);

на фиг. 2 показан линейчатый график, иллюстрирующий типичные результаты анализа PreF точным фракционированием в асимметричном поле (AFF-MALS);

на фиг. 3 представлена столбчатая диаграмма, показывающая ингибирование PreF-антигеном способности сыворотки человека к нейтрализации;

на фиг. 4А и В представлена столбчатая диаграмма, показывающая титры IgG в сыворотке, вызванные у мышей в ответ на антиген PreF;

на фиг. 5А и В представлена столбчатая диаграмма, иллюстрирующая титры нейтрализующих антител, специфичных для РСВ, вызванных антигеном PreF;

на фиг. 6А и В представлены графики, показывающие защиту против заражения, обеспечиваемую антигеном PreF РСВ у мышей;

фиг. 7 представляет собой график оценки лейкоцитов BAL после иммунизации и заражения;

на фиг. 8 представлена столбчатая диаграмма, иллюстрирующая IgG в сыворотке, полученный после иммунизации PreF, приготовленным с разными разведениями эмульсии типа масло-в-воде (AS03);

на фиг. 9 представлена столбчатая диаграмма, иллюстрирующая титры нейтрализующих антител после иммунизации PreF, приготовленным с разведениями эмульсии типа масло-в-воде (AS03);

фиг. 10 представляет собой график, иллюстрирующий защиту от заражения после иммунизации PreF, приготовленным с разведениями эмульсии типа масло-в-воде (AS03).

Подробное описание

Введение.

Разработка вакцин для профилактики РСВ-инфекции была осложнена тем фактом, что иммунные ответы хозяина, по-видимому, играют роль в патогенезе заболевания. Ранние исследования 1960-х годов показали, что дети, которым вводили вакцину на основе инактивированного формалином РСВ, страдали от более тяжелого заболевания при последующем воздействии вируса, по сравнению с невакцинированными контрольными лицами. Такие ранние испытания привели к госпитализации 80% вакцинированных пациентов и двум смертельным исходам. Повышенная тяжесть заболевания была воспроизведена в животных моделях и, как полагают, является результатом неадекватных уровней нейтрализующих антител в сыворотке, отсутствия местного иммунитета и чрезмерной индукции иммунного ответа, подобного ответу Т-клеток-хелперов типа 2 (Th2) с легочной эозинофилией и повышенной продукцией цитокинов IL-4 и IL-5. Напротив, успешная вакцина, которая защищает от РСВ-инфекции, индуцирует иммунный ответ, смещенный в сторону Th1, характеризуемый продукцией IL-2 и γ -интерферона (IFN).

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным антигенам респираторно-синцитиального вируса (РСВ), которые решают проблемы, имеющие место в случае антигенов РСВ, ранее используемых в вакцинах, и улучшают иммунологические свойства антигена, а также свойства, важные при производстве антигена. Рекомбинантные антигены РСВ, описанные в настоящей публикации, включают аналог белка слияния (F), который включает растворимый полипептид F-белка, который был модифицирован так, чтобы стабилизировать имеющуюся перед слиянием конформацию F-белка, то есть конформацию зрелого собранного F-белка перед слиянием с мембраной клетки хозяина. Такие аналоги F-белка обозначены "PreF" или "PreF-антигены" в целях ясности и простоты. PreF-антигены, описанные в настоящей публикации, предложены на основании неожиданного открытия того, что растворимые аналоги F-белка, которые были модифицированы так, чтобы они включали в себя гетерологичный домен тримеризации, проявляют повышенные иммуногенные свойства, являются безопасными и обеспечивают высокую степень защиты при введении пациенту *in vivo*.

Подробное описание структуры F-белка РСВ представлено в настоящей публикации с использованием терминологии и обозначений, широко принятых в данной области, и схематично проиллюстрировано на фиг. 1А. Схематичная иллюстрация примеров PreF-антигенов представлена на фиг. 1В. Специалистам в данной области будет понятно, что любой F-белок РСВ может быть модифицирован, чтобы стабилизировать имеющуюся до слияния конформацию согласно инструкциям, приведенным в настоящем описании. Поэтому, чтобы облегчить понимание принципов, на которых основано получение PreF-антигенов, отдельные структурные компоненты будут указаны со ссылкой на пример F-белка, полинуклеотидная и аминокислотная последовательности которого представлены в SEQ ID NO:1 и 2 соответственно. Подобным образом, в применимых случаях антигены G-белка описаны со ссылкой на пример G-белка, полинуклеотидная и аминокислотная последовательности которого представлен в SEQ ID NO:3 и 4 соответственно.

На основании первичной аминокислотной последовательности полипептида F-белка (фиг. 1А) использовали следующие термины для описания структурных признаков PreF-антигенов.

Термин F₀ относится к полноразмерному транслированному предшественнику F-белка. Полипептид F₀ может быть подразделен на домен F2 и домен F1, которые разделены промежуточным пептидом, называемым pep27. Во время созревания полипептид F₀ подвергается протеолитическому расщеплению в двух сайтах фурина, расположенных между F2 и F1 и фланкируемых pep27. В целях последующего обсуждения домен F2 включает по меньшей мере часть, и вплоть до всех аминокислот 1-109, и растворимая часть домена F1 включает по меньшей мере часть, и вплоть до всех аминокислот 137-526 F-белка. Как указано выше, такие положения аминокислот (и все последующие положения аминокислот, названные в настоящем описании) приведены на основании иллюстративного полипептида F-белка (F₀) с последовательностью SEQ ID NO:2.

Антиген F перед слиянием (или "PreF") является растворимым (то есть не связанным с мембраной) аналогом F-белка, который содержит по меньшей мере одну модификацию, которая стабилизирует име-

ющуюся до слияния конформацию F-белка, так что антиген PCB сохраняет по меньшей мере один иммунодоминантный эпитоп конформации F-белка, которую он имеет до слияния. Растворимый полипептид F-белка включает домен F2 и домен F1 F-белка PCB (но не содержит трансмембранного домена F-белка PCB). В иллюстративных вариантах домен F2 содержит аминокислоты 26-105, а домен F1 содержит аминокислоты 137-516 F-белка. Однако можно использовать меньшие по размеру части при условии, что трехмерная конформация стабилизированного антигена PreF сохраняется. Подобным образом, полипептиды, которые содержат дополнительные структурные компоненты (например, полипептиды слияния), также можно использовать вместо приведенных в качестве примера доменов F2 и F1 при условии, что дополнительные компоненты не нарушают трехмерную конформацию или не оказывают иного неблагоприятного влияния на стабильность, продукцию или процессинг, или не снижают иммуногенность антигена. Домены F2 и F1 расположены в ориентации от N-конца к C-концу, чтобы воспроизвести фолдинг и сборку аналога F-белка в зрелую конформацию, характерную для белка перед слиянием. Чтобы повысить продукцию, домену F2 может предшествовать сигнальный пептид секреции так, чтобы выбранный нативный сигнальный пептид F-белка или гетерологичный сигнальный пептид усиливал продукцию и секрецию в клетках-хозяевах, в которых необходимо экспрессировать рекомбинантный антиген PreF.

Антигены PreF стабилизируют (в тримерной конформации перед слиянием) введением одной или нескольких модификаций, таких как добавление, делеция или замена одной или нескольких аминокислот. Одной из таких стабилизирующих модификаций является добавление аминокислотной последовательности, содержащей гетерологичный стабилизирующий домен. В иллюстративных вариантах гетерологичный стабилизирующий домен представляет собой домен мультимеризации белка. Одним особенно предпочтительным примером такого домена мультимеризации белка является домен изолейциновой молнии, который стимулирует тримеризацию нескольких полипептидов, имеющих такой домен. Пример домена изолейциновой молнии показан в SEQ ID NO:11. Обычно гетерологичный стабилизирующий домен расположен на C-конце от домена F1.

Необязательно домен мультимеризации связан с доменом F1 через короткую аминокислотную линейную последовательность, такую как последовательность GG. Линкером также может быть более длинный линкер (например, включающий последовательность GG, такой как аминокислотная последовательность: GGS GGSGGS; SEQ ID NO:14). В данной области известны многочисленные конформационно нейтральные линкеры, которые могут быть использованы в данном контексте без нарушения конформации антигена PreF.

Другой стабилизирующей модификацией является исключение сайта узнавания и расщепления фурином, который расположен между доменами F2 и F1 в нативном белке F₀. Один или оба сайта узнавания фурином, расположенные в положениях 105-109 и в положениях 133-136, могут быть исключены делетированием или заменой одной или нескольких аминокислот сайтов узнавания фурином так, чтобы протеаза была неспособна расщеплять полипептид PreF на составляющие его домены. Необязательно промежуточный пептид pep27 также может быть удален или заменен, например, линкерным пептидом. Дополнительно или необязательно нефуриновый сайт расщепления (например, сайт металлопротеиназы в положениях 112-113) вблизи пептида слияния может быть удален или заменен.

Другим примером стабилизирующей мутации является добавление или замена гидрофильной аминокислотой в гидрофобном домене F-белка. Обычно заряженная аминокислота, такая как лизин, может быть добавлена или введена в виде замены нейтрального остатка, такого как лейцин, в гидрофобную область. Например, гидрофильная аминокислота может быть добавлена или может заменять гидрофобную или нейтральную аминокислоту в суперспирализованном домене HRB внеклеточного домена F-белка. В качестве примера заряженный остаток аминокислоты, такой как лизин, может заменять лейцин, присутствующий в положении 512 F-белка. Альтернативно или дополнительно, гидрофильная аминокислота может быть добавлена или может заменять гидрофобную или нейтральную аминокислоту в домене HRA F-белка. Например, одна или несколько заряженных аминокислот, таких как лизин, могут быть встроены в положение 105-106 или вблизи указанного положения (например, после аминокислоты, соответствующей остатку 105 в эталонной последовательности SEQ ID NO:2, например, между аминокислотами 105 и 106 антигена PreF). Необязательно гидрофильные аминокислоты могут быть добавлены или введены в качестве замены в обоих доменах HRA и HRB. Альтернативно, один или несколько гидрофобных остатков могут быть делетированы при условии, что это не окажет неблагоприятного влияния на общую конформацию антигена PreF.

Дополнительно или альтернативно, может быть осуществлена одна или несколько модификаций, которые изменяют сайт гликозилирования антигена PreF. Например, одна или несколько аминокислот в сайте гликозилирования, присутствующих в нативном F-белке PCB, например, в положении аминокислотного остатка 500 или вокруг него (по сравнению с SEQ ID NO:2) могут быть делетированы или заменены (или аминокислота может быть добавлена так, чтобы нарушить сайт гликозилирования), чтобы увеличить или уменьшить статус гликозилирования антигена PreF. Например, аминокислоты, соответствующие положениям 500-502 в последовательности SEQ ID NO:2, могут быть выбраны из NGS, NKS, NGT и NKT. Таким образом, в некоторых вариантах антигена PreF включают растворимый полипептид F-белка, содержащий домен F2 (например, соответствующим аминокислотам 26-105 в SEQ ID NO:2) и

домен F1 (например, соответствующий аминокислотам 137-516 в SEQ ID NO:2) полипептида F-белка PCB, в который была введена по меньшей мере одна модификация, которая изменяет гликозилирование. Антиген PreF PCB обычно содержит интактный пептид слияния между доменом F2 и доменом F1. Не обязательно антиген PreF содержит сигнальный пептид.

Как описано выше, такие полипептиды F-белка могут иметь по меньшей мере одну модификацию, выбранную из (i) добавления аминокислотной последовательности, содержащей гетерологичный домен тримеризации (такой как домен изолейциновой молнии); (ii) делеции по меньшей мере одного сайта расщепления фурином; (iii) делеции по меньшей мере одного нефуринового сайта расщепления; (iv) делеции одной или нескольких аминокислот домена pep27 и (v) по меньшей мере одной замены или добавления гидрофильной аминокислоты в гидрофобный домен внеклеточного домена F-белка. Как описано выше, такие модифицированные по гликозилированию антигены PreF PCB собираются в мультимеры, например тримеры.

В иллюстративных вариантах модифицированные по гликозилированию антигены PreF выбраны из группы, состоящей из а) полипептида, содержащего или состоящего из последовательности SEQ ID NO:22; б) полипептида, кодируемого последовательностью SEQ ID NO:21 или полинуклеотидной последовательностью, которая гибридизуется в жестких условиях, по существу, по всей длине с последовательностью SEQ ID NO:21; в) полипептида, имеющего по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO:22.

Любую и/или все стабилизирующие модификации можно использовать по отдельности и/или в сочетании с любыми другими стабилизирующими модификациями, описанными в настоящей публикации, чтобы получить антиген PreF. В иллюстративных вариантах белок PreF содержит полипептид, включающий домен F2 и домен F1 без промежуточного сайта расщепления фурином между доменом F2 и доменом F1 и с гетерологичным стабилизирующим доменом (например, доменом тримеризации), расположенным на С-конце от домена F1. В некоторых вариантах антиген PreF также содержит одно или несколько добавлений и/или замен гидрофильным остатком в гидрофобном домене HRA и/или HRB. Не обязательно антиген PreF имеет модификацию по меньшей мере одного нефуринового сайта расщепления, такого как сайт металлопротеиназы.

Антиген PreF необязательно содержит дополнительный полипептидный компонент, который включает, по меньшей мере, иммуногенную часть G-белка PCB. То есть в некоторых вариантах антиген PreF представляет собой химерный белок, который содержит как F-белковый компонент, так и G-белковый компонент. F-белковый компонент может представлять собой любой из антигенов PreF, описанных выше, а G-белковый компонент выбирают так, чтобы он представлял собой иммунологически активную часть G-белка PCB (вплоть до и/или включая полноразмерный G-белок). В иллюстративных вариантах полипептид G-белка содержит аминокислоты 149-229 G-белка (при этом положения аминокислот обозначены на основе последовательности G-белка, показанной в SEQ ID NO:4). Специалисту в данной области будет понятно, что можно использовать меньшую по размеру часть или фрагмент G-белка при условии, что выбранная часть сохраняет доминантные иммунологические свойства более крупного фрагмента G-белка. В частности, выбранный фрагмент сохраняет иммунологические свойства доминантного эпитопа примерно в области положений аминокислот 184-198 (например, аминокислоты 180-200) и является достаточно длинным, чтобы укладываться и собираться в стабильную конформацию, которая представляет иммунодоминантный эпитоп. Также можно использовать более длинные фрагменты, например примерно от аминокислоты 128 до примерно аминокислоты 229, вплоть до полноразмерного G-белка, при условии, что выбранный фрагмент укладывается в стабильную конформацию в контексте химерного белка и не мешает продуцированию, процессингу или стабильности при рекомбинантном получении в клетках-хозяевах. Необязательно G-белковый компонент связан с F-белковым компонентом через короткую аминокислотную линкерную последовательность, такую как последовательность GG. Линкер также может представлять собой более длинный линкер (такой как аминокислотная последовательность GGSGGSGGS: SEQ ID NO:14). В данной области известны многочисленные конформационно нейтральные линкеры, которые можно использовать в данном контексте, не нарушая конформацию антигена PreF.

Необязательно G-белковый компонент может содержать одну или несколько аминокислотных замен, которые уменьшают или предотвращают более тяжелое вирусное заболевание в животной модели заболевания, вызванного PCB. То есть G-белок может иметь аминокислотную замену, так что при введении иммуногенной композиции, содержащей химерный антиген PreF-G, пациенту, выбранному из приемлемой животной модели (например, мышинной модели PCB), у пациента наблюдались ослабленные симптомы или отсутствовали симптомы усиливаемого вакциной вирусного заболевания (например, эозинофилии, нейтрофилии) по сравнению с контрольным животным, получающим вакцину, включая вакцину, которая содержит немодифицированный G-белок. Ослабление и/или предотвращение усиливаемого вакциной вирусного заболевания может наблюдаться, когда иммуногенные композиции вводят в отсутствие адьюванта (но не наблюдаются, например, когда антигены вводят в присутствии сильного индуцирующего Th1 адьюванта). Кроме того, аминокислотная замена может ослаблять или предотвращать усиливаемое вакциной вирусное заболевание при введении человеку. Примером подходящей аминокис-

лотной замены является замена аспарагина в положении 191 аланином (Asn → Ala в положении 191: N191A).

Необязательно любой антиген PreF, описанный выше, может содержать дополнительную последовательность, которая помогает при очистке. Одним из примеров является полигистидиновая метка. Такая метка при желании может быть удалена из конечного продукта.

При экспрессии антигена PreF подвергаются внутримолекулярному фолдингу и сборке в зрелый белок, который содержит мультимер полипептидов. Предпочтительно полипептиды антигена PreF собираются в тример, который похож на имеющуюся перед слиянием конформацию зрелого процессированного F-белка.

Любой из антигенов PreF (включая антигены PreF-G), описанных в настоящей публикации, можно предпочтительно использовать в иммуногенных композициях для того, чтобы вызвать защитный иммунный ответ против РСВ. Такие иммуногенные композиции обычно содержат фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент, такой как буфер. Чтобы усилить иммунный ответ, получаемый после введения, иммуногенная композиция обычно также содержит адъювант. В случае иммуногенных композиций, предназначенных для того, чтобы вызвать защитный иммунный ответ против РСВ (например, вакцин), композиции предпочтительно содержат адъювант, который преимущественно вызывает Th1-иммунный ответ (адъювант, смещающий ответ в сторону Th). Обычно адъювант выбирают так, чтобы он подходил для введения целевой популяции, которой необходимо введение композиции. Таким образом, в зависимости от применения адъювант выбирают так, чтобы он подходил для введения, например, новорожденным или пожилым людям.

Иммуногенные композиции, описанные в настоящей публикации, предпочтительно используют в качестве вакцин для уменьшения или предотвращения инфекции РСВ без индуцирования патологической реакции (такой как усиливаемое вакциной вирусное заболевание) после введения или воздействия РСВ.

В некоторых вариантах иммуногенная композиция содержит антиген PreF (такой как примерный вариант, показанный в SEQ ID NO:6) и второй полипептид, который включает G-белковый компонент. G-белковый компонент обычно содержит по меньшей мере аминокислоты 149-229 G-белка. Хотя можно использовать меньшие по размеру части G-белка, такие фрагменты должны включать, как минимум, иммунологический доминантный эпитоп из аминокислот 184-198. Альтернативно, G-белок может включать более крупную часть G-белка, такую как аминокислоты 128-229 или 130-230, необязательно в виде элемента более крупного белка, такого как полноразмерный G-белок или химерный полипептид.

В других вариантах иммуногенная композиция содержит антиген PreF, который является химерным белком, который также содержит G-белковый компонент (такой как примерные варианты, показанные в SEQ ID NO:8 и 10). G-белковый компонент такого химерного антигена PreF (или PreF-G) обычно содержит, по меньшей мере, аминокислоты 149-229 G-белка. Как указано выше, также можно использовать меньшие или большие по размеру фрагменты (такие как аминокислоты 129-229 или 130-230) G-белка при условии, что сохраняются иммунодоминантные эпитопы и не оказывается неблагоприятное влияние на конформацию антигена PreF-G.

Необязательно иммуногенные композиции также могут содержать по меньшей мере один дополнительный антиген патогенного организма, отличный от РСВ. Например, патогенным организмом является другой вирус, отличный от РСВ, такой как вирус парагриппа (PIV), кори, гепатита В, вирус полиомиелита или вирус гриппа. Альтернативно, патогенным организмом может быть бактерия, такая как дифтерийная, столбнячная бактерия, бактерия, вызывающая коклюш, *Haemophilus influenzae* и *Pneumococcus*.

Рекомбинантные нуклеиновые кислоты, которые кодируют любой из антигенов PreF (включая антигены PreF-G), также являются отличительным признаком настоящего изобретения. В некоторых вариантах полинуклеотидную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует антиген PreF, оптимизируют для экспрессии в выбранном хозяине (таком как клетки CHO, другие клетки млекопитающих или клетки насекомых). Соответственно векторы, включая экспрессирующие векторы (включая прокариотические и эукариотические экспрессирующие векторы), являются отличительным признаком настоящего изобретения. Подобным образом, клетки-хозяева, содержащие такие нуклеиновые кислоты и векторы, являются отличительным признаком настоящего изобретения. Такие нуклеиновые кислоты также можно применять в контексте иммуногенных композиций для введения пациенту, чтобы вызвать иммунный ответ, специфичный для РСВ.

Антигены PreF предпочтительно применяют для профилактики и/или лечения РСВ-инфекции. Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к способу, позволяющему вызвать иммунный ответ против РСВ. Способ включает введение иммунологически эффективного количества композиции, содержащей антиген PreF, пациенту (такому как человек или животное).

Введение иммунологически эффективного количества композиции вызывает иммунный ответ, специфичный для эпитопов, присутствующих на антигене PreF. Такой иммунный ответ может включать В-клеточный ответ (например, продукцию нейтрализующих антител) и/или Т-клеточные ответы (например, продукцию цитокинов). Предпочтительно иммунный ответ, вызванный антигеном PreF, включает элементы, который специфичны по меньшей мере для одного конформационного эпитопа, присутствующе-

го на конформации до слияния F-белка РСВ. Антигены PreF и композиции можно вводить пациенту без усиления вирусного заболевания после контакта с РСВ. Предпочтительно антигены PreF, описанные в настоящей публикации, и соответствующим образом полученные иммуногенные композиции вызывают иммунный ответ, смещенный в сторону Th1, который ослабляет или предотвращает инфекцию РСВ и/или уменьшает или предотвращает патологический ответ после инфекции РСВ.

Иммуногенные композиции могут быть введены различными путями, включая такие пути, как интраназальный, который позволяет непосредственно приводить антиген PreF в контакт со слизистой оболочкой верхних дыхательных путей. Альтернативно, можно использовать более традиционные пути введения, такие как внутримышечный путь введения.

Таким образом, также предполагается применение любого из описанных антигенов РСВ (или нуклеиновых кислот) при получении лекарственного средства для лечения РСВ-инфекции (например, профилактического лечения или профилактики РСВ-инфекции). Соответственно настоящее изобретение относится к описанным рекомбинантным антигенам РСВ или иммуногенным композициям для применения в медицине, а также к их применению для профилактики или лечения РСВ-ассоциированных заболеваний.

Дополнительные детали, имеющие отношение к антигенам PreF и способам их применения, приведены в описании и примерах ниже.

Термины.

Чтобы облегчить обзор различных вариантов осуществления настоящего изобретения, приведены следующие объяснения терминов. Дополнительные термины и пояснения могут быть приведены в контексте настоящего описания.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, которое обычно придает таким терминам специалист в области, к которой настоящее изобретение относится. Определения общих терминов молекулярной биологии можно найти в работах Benjamin Lewin, *Genes V*, опубликованной Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew с соавт. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, опубликованной Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); и Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, опубликованной VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Формы единственного числа включают множественные объекты, если контекст ясно не указывает иное. Подобным образом подразумевается, что слово включает "и", если контекст ясно не указывает иное. Термин "множество" относится к двум или большему количеству. Кроме того, должно быть понятно, что все размеры в количестве оснований или размеры в количестве аминокислот и все значения молекулярных весов или молекулярных масс, приведенные для нуклеиновых кислот или полипептидов, являются приблизительными и приведены для описания. Кроме того, подразумевается, что числовые ограничения, приведенные по отношению к концентрациям или уровням вещества, такого как антиген, являются приблизительными. Таким образом, в том случае, когда указывают концентрацию, составляющую по меньшей мере (например) 200 пг, подразумевают, что следует понимать, что концентрация составляет, по меньшей мере, приблизительно (или "примерно" или "~") 200 пг.

Хотя при практическом осуществлении или проверке изобретения можно использовать способы и вещества, сходные или эквивалентные способам и веществам, описанным в настоящей публикации, подходящие способы и вещества описаны ниже. Термин "содержит" означает "включает". Таким образом, если контекст не требует иного, следует понимать, что слово "содержит" и варианты, такие как "содержат" и "содержащий", будут означать включение указанного соединения или композиции (например, нуклеиновой кислоты, полипептида, антигена) или стадии, или группы соединений или стадий, но не исключение каких-либо других соединений, композиций, стадий или их групп. Сокращение "e.g." получено из латинского "exempli gratia" и используется в настоящем описании для указания не ограничивающего примера. Таким образом, сокращение "e.g." является синонимом термина "например".

Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) является патогенным вирусом семейства Paramyxoviridae, подсемейства Pneumovirinae, рода Pneumovirus. Геном РСВ представлен минус-смысловой молекулой РНК, которая кодирует 11 белков. Тесная ассоциация РНК-генома с вирусным N-белком образует нуклеокапсид, свернутый внутри вирусной оболочки. Описаны две группы штаммов РСВ человека, группы А и В, на основе различий в антигенности гликопротеида G. До настоящего времени выделены многочисленные штаммы РСВ. Примеры штаммов, указанных с номерами доступа в GenBank и/или EMBL, можно найти в публикации WO 2008114149, которая включена в настоящее описание в виде ссылки в целях описания последовательностей нуклеиновых кислот и полипептидов F- и G-белков РСВ, подходящих для применения в антигенах PreF (включая химерные антигены PreF-G) и в сочетаниях с антигенами PreF. Могут быть выделены дополнительные штаммы РСВ, которые относятся к роду РСВ. Подобным образом, род РСВ охватывает варианты, возникающие из встречающихся в природе (например, ранее или позже идентифицированные штаммы) в результате генетического дрейфа или искусственного синтеза и/или рекомбинации.

Термин "F-белок" или "белок слияния" или "полипептид F-белка" или "полипептид белка слияния" относится к полипептиду или белку, имеющему всю или часть аминокислотной последовательности по-

липептида белка слияния РСВ. Подобным образом, термин "G-белок" или "полипептид G-белка" относится к полипептиду или белку, имеющему всю или часть аминокислотной последовательности полипептида белка прикрепления РСВ. Многочисленные белки слияния и прикрепления РСВ описаны и известны специалистам в данной области. В WO 2008114149 описаны примеры вариантов F- и G-белков (например, встречающиеся в природе варианты), общедоступных на дату подачи настоящей заявки.

"Вариант" по отношению к нуклеиновой кислоте или полипептиду (например, нуклеиновой кислоте или полипептиду F- или G-белка РСВ или нуклеиновой кислоте или полипептиду PreF) представляет собой нуклеиновую кислоту или полипептид, который отличается от эталонной нуклеиновой кислоты или полипептида. Обычно различие(ия) между вариантом и эталонной нуклеиновой кислотой или полипептидом представляет собой пропорционально небольшое количество отличий по сравнению с эталоном.

"Домен" полипептида или белка представляет собой структурно определенный элемент в полипептиде или белке. Например, "доменом тримеризации" является аминокислотная последовательность в полипептиде, которая симулирует сборку полипептида в тримеры. Например, домен тримеризации может стимулировать сборку в тримеры посредством ассоциаций с другими доменами тримеризации (дополнительными полипептидами с такой же или другой аминокислотной последовательностью). Термин также используют по отношению к полинуклеотиду, который кодирует такой пептид или полипептид.

Термины "нативный" и "встречающийся в природе" относятся к элементу, такому как белок, полипептид или нуклеиновая кислота, который присутствует в таком же состоянии в природе. То есть элемент не был модифицирован искусственно. Будет понятно в контексте настоящего описания, что существуют многочисленные нативные/встречающиеся в природе варианты белков или полипептидов РСВ, например, полученных из разных встречающихся в природе штаммов или изолятов РСВ.

Термин "полипептид" относится к полимеру, в котором мономерами являются остатки аминокислот, которые связаны вместе амидными связями. Подразумевается, что термины "полипептид" или "белок" в используемом в настоящем описании смысле охватывают любую аминокислотную последовательность и включают модифицированные последовательности, такие как гликопротеиды.

Подразумевается, что термин "полипептид" специально охватывает встречающиеся в природе белки, а также полученные рекомбинантно или синтетически. Термин "фрагмент" в отношении полипептида относится к части (то есть подпоследовательности) полипептида. Термин "иммуногенный фрагмент" относится ко всем фрагментам полипептида, которые сохраняют по меньшей мере один доминантный иммуногенный эпитоп полноразмерного эталонного белка или полипептида. Ориентация в пределах полипептида обычно указана в направлении от N-конца к C-концу, определяемых по ориентации амино- и карбоксильных остатков отдельных аминокислот. Полипептиды транслируются от N- или аминоконца по направлению к C- или карбоксильному концу.

"Сигнальный пептид" представляет собой короткую аминокислотную последовательность (например, длиной примерно 18-25 аминокислот), которая направляет вновь синтезированные секреторные или мембранные белки в мембраны и через мембраны, например, эндоплазматической сети. Сигнальные пептиды часто, но не всегда, расположены на N-конце полипептида и часто отщепляются сигнальными пептидазами после того, как белок пересекает мембрану. Сигнальные последовательности обычно обладают тремя общими структурными признаками: N-концевой полярной основной области (n-области), гидрофобной центральной части и гидрофильной c-области).

Термины "полинуклеотид" и "последовательность нуклеиновой кислоты" относятся к полимерной форме нуклеотидов длиной по меньшей мере 10 оснований. Нуклеотиды могут представлять собой рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды или модифицированные формы любого нуклеотида. Термин включает одонитевые и двунитевые формы ДНК. Термин "изолированный полинуклеотид" означает полинуклеотид, который не является непосредственно соседствующим с обеими кодирующими последовательностями, с которыми он непосредственно соседствует (одна на 5'-конце и одна на 3'-конце) во встречающемся в природе геноме организма, из которого он получен. В одном варианте полинуклеотид кодирует полипептид. 5'- и 3'-направление нуклеиновой кислоты определяют, исходя из связи отдельных нуклеотидных единиц, и обозначают согласно положениям атомов углерода в кольце сахара дезоксирибозы (или рибозы). Информация (закодированная информация) в последовательности полинуклеотида считывается в 5'- и 3'-направлении.

"Рекомбинантной" нуклеиновой кислотой является нуклеиновая кислота, которая имеет последовательность, которая не встречается в природе, или имеет последовательность, которая получена в результате искусственного сочетания двух в ином случае разделенных участков последовательности. Такое искусственное сочетание можно осуществлять посредством химического синтеза или чаще посредством искусственной обработки выделенных участков нуклеиновых кислот, например, способами генетической инженерии. "Рекомбинантным" белком является белок, который кодируется гетерологичной (например, рекомбинантной) нуклеиновой кислотой, которая была введена в клетку-хозяина, такую как бактериальная или эукариотическая клетка. Нуклеиновая кислота может быть введена в экспрессирующем векторе, имеющем сигналы, способные вызывать экспрессию белка, кодируемого введенной нуклеиновой кислотой, или нуклеиновая кислота может быть интегрирована в хромосому клетки-хозяина.

Термин "гетерологичный" по отношению к нуклеиновой кислоте, полипептиду или другому клеточному компоненту указывает, что компонент находится там, где он обычно не встречается в природе, и/или что он происходит из другого источника или вида.

Термин "очистка" (например, по отношению к патогену или композиции, содержащей патоген) относится к процессу удаления компонентов из композиции, присутствие которых нежелательно. Очистка является относительным понятием и не требует, чтобы все следы нежелательного компонента были удалены из композиции. В контексте получения вакцин очистка включает такие способы как центрифугирование, диализация, ионообменная хроматография и эксклюзионная хроматография по размеру, аффинная очистка или преципитация. Таким образом, термин "очищенный" не требует абсолютной чистоты и он предназначен в качестве относительного понятия. Таким образом, например, очищенный препарат нуклеиновой кислоты или белка представляет собой препарат, который более обогащен конкретной нуклеиновой кислотой или белком, чем нуклеиновая кислота или белок в среде, где они образуются, например, в клетке или камере, где происходит биохимическая реакция. Препарат, по существу, чистой нуклеиновой кислоты или белка может быть очищен так, что требуемая нуклеиновая кислота присутствует в количестве, составляющем по меньшей мере 50% от общего содержания нуклеиновой кислоты в препарате. В некоторых вариантах, по существу, чистая нуклеиновая кислота будет присутствовать в количестве, составляющем по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 95% или больше от общего содержания нуклеиновой кислоты или белка в препарате.

"Изолированный" биологический компонент (такой как молекула нуклеиновой кислоты, белок или органелла), по существу, отделяют или очищают от других биологических компонентов клетки организма, в которой компонент встречается в природе, таких как другие хромосомные и внехромосомные ДНК и РНК, белки и органеллы. Нуклеиновые кислоты и белки, которые были "изолированы", включают нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными способами очистки. Термин также охватывает нуклеиновые кислоты и белки, полученные посредством рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты и белки.

"Антигеном" является соединение, композиция или вещество, которое стимулирует продукцию антител и/или Т-клеточный ответ у животного, включая композиции, которые инъекцированы, поглощены или иным образом введены животному. Термин "антиген" включает все родственные антигенные эпитопы. Термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта" относится к участку антигена, на который отвечают В- и/или Т-клетки. "Доминантные антигенные эпитопы" или "доминантные эпитопы" представляют собой такие эпитопы, к которым вырабатывается функционально значимый иммунный ответ хозяина, например гуморальный ответ или Т-клеточный ответ. Таким образом, что касается защитного иммунного ответа против патогена, то доминантными антигенными эпитопами являются такие антигенные остатки, которые при распознавании иммунной системой хозяина приводят к защите от заболевания, вызванного патогеном. Термин "Т-клеточный эпитоп" относится к эпитопу, который будучи связанным с соответствующей молекулой МНС специфично связывается Т-клеткой (с помощью Т-клеточного рецептора). "В-клеточным эпитопом" является эпитоп, который специфично связывается антителом (или молекулой В-клеточного рецептора).

"Адьювантом" является средство, которое усиливает выработку иммунного ответа неспецифичным образом. Обычные адьюванты включают суспензии минералов (квасцы, гидроксид алюминия, фосфат алюминия), на которых адсорбируется антиген; эмульсии, включая эмульсии типа вода-в-масле и масло-в-воде (и их варианты, включая двойные эмульсии и обратимые эмульсии), липосахариды, липополисахариды, иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты (такие как олигонуклеотиды CpG), липосомы, агонисты Toll-подобного рецептора (в частности, агонисты TLR2, TLR4, TLR7/8 и TLR9) и различные сочетания таких компонентов.

"Иммуногенная композиция" представляет собой композицию вещества, подходящую для введения человеку или животному (например, в условиях эксперимента), которая способна вызывать специфичный иммунный ответ, например, против патогена, такого как РСВ. Как таковая иммуногенная композиция включает один или несколько антигенов (например, полипептидных антигенов) или антигенных эпитопов. Иммуногенная композиция также может содержать один или несколько дополнительных компонентов, способных вызывать или усиливать иммунный ответ, таких как эксципиент, носитель и/или адьювант. В некоторых случаях иммуногенные композиции вводят для того, чтобы вызвать иммунный ответ, который защищает пациента от проявления симптомов или состояний, индуцируемых патогеном. В некоторых случаях симптомы или заболевание, вызываемые патогеном, предотвращаются (или уменьшаются или ослабляются) в результате ингибирования репликации патогена (например, РСВ) после того, как пациент подвергается воздействию патогена. В контексте настоящего описания следует понимать, что термин иммуногенная композиция охватывает композиции, которые предполагается вводить пациенту или популяции пациентов для того, чтобы вызвать защитный или паллиативный иммунный ответ против РСВ (то есть композиции вакцин или вакцин).

"Иммунным ответом" является ответ клетки иммунной системы, такой как В-клетка, Т-клетка или моноцит, на стимул. Иммунный ответ может быть В-клеточным ответом, который приводит к продукции

специфичных антител, таких как антигенспецифичные нейтрализующие антитела. Иммунный ответ также может быть Т-клеточным ответом, таким как ответ CD4+ или ответ CD8+. В некоторых случаях ответ специфичен для конкретного антигена (то есть "антигенспецифичный ответ"). Если антиген получен из патогена, то антигенспецифичный ответ является "специфичным для патогена ответом". "Защитным иммунным ответом" является иммунный ответ, который ингибирует приносящую вред функцию или активность патогена, снижает инфекцию патогеном или уменьшает симптомы (включая гибель), которые являются результатом инфекции патогеном. Защитный иммунный ответ может быть измерен, например, по ингибированию репликации вируса или образования бляшек в анализе уменьшения образования бляшек или анализе нейтрализации в ELISA, или посредством измерения устойчивости к заражению патогеном *in vivo*.

Иммунный ответ, смещенный в сторону "Th1", характеризуется присутствием хелперных Т-клеток CD4+, которые продуцируют IL-2 и IFN- γ , и, следовательно, секрецией или присутствием IL-2 и IFN- γ . Напротив, иммунный ответ, смещенный в сторону "Th2", характеризуется преобладанием хелперных клеток CD4+, которые продуцируют IL-4, IL-5 и IL-13.

"Иммунологически эффективным количеством" является количество композиции (обычно иммуногенной композиции), используемое для того, чтобы вызвать иммунный ответ у пациента на композицию или на антиген в композиции. Обычно требуемым результатом является выработка специфичного для антигена (например, для патогена) иммунного ответа, который способен или вносит вклад в защиту пациента от патогена. Однако, чтобы получить защитный иммунный ответ против патогена, может потребоваться многократное введение иммуногенной композиции. Таким образом, в контексте настоящего описания термин "иммунологически эффективное количество" охватывает дробную дозу, которая вместе с предыдущими или последующими введениями вносит вклад в достижение защитного иммунного ответа.

Прилагательное "фармацевтически приемлемый" указывает, что указанный объект подходит для введения пациенту (например, человеку или животному). В публикации Remington's Pharmaceutical Sciences, E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975) описаны композиции и препараты (включая разбавители), подходящие для фармацевтической доставки терапевтических и/или профилактических композиций, включая иммуногенные композиции.

Термин "модулировать" в отношении ответа, такого как иммунный ответ, означает изменять или варьировать начало, величину, продолжительность или характеристики ответа. Средство, которое модулирует иммунный ответ, изменяет по меньшей мере один из показателей: начало, величину, продолжительность или характеристики иммунного ответа после его введения, или изменяет по меньшей мере один из показателей: начало, величину, продолжительность или характеристики, по сравнению с эталонным средством.

Термин "уменьшает" является относительным понятием, так что средство уменьшает ответ или состояние, если показатели ответа или состояния количественно снижаются после введения средства, или если они снижаются после введения средства по сравнению с эталонным средством. Подобным образом, термин "предотвращает" не обязательно означает, что средство полностью исключает ответ или состояние при условии, что по меньшей мере одна характеристика ответа или состояния исключается. Таким образом, иммуногенная композиция, которая уменьшает или предотвращает инфекцию или ответ, такой как патологический ответ, например усиливаемое вакциной вирусное заболевание, может, но не обязательно, полностью исключать такую инфекцию или ответ при условии, что инфекция или ответ измеримо уменьшаются, например, по меньшей мере примерно на 50%, например по меньшей мере примерно на 70 или примерно на 80, или даже примерно на 90% (то есть до 10% или меньше) по сравнению с инфекцией или ответом в отсутствие средства или по сравнению с эталонным средством.

"Пациентом" является живой многоклеточный организм позвоночного. В контексте настоящего описания пациентом может быть экспериментальный пациент, такой как животное, отличное от человека, например мышь, хлопковый хомяк или примат, отличный от человека. Альтернативно, пациентом может быть человек.

Антигены PreF.

В природе F-белок РСВ экспрессируется в виде одного полипептидного предшественника длиной 574 аминокислот, называемого F0. *In vivo* F0 олигомеризуется в эндоплазматической сети и протеолитически процессируется протеазой фурином в двух консервативных консенсусных последовательностях для фурина (сайтах расщепления фурином), RARR¹⁰⁹ (SEQ ID NO:15) и RKRR¹³⁶ (SEQ ID NO:16) с образованием олигомера, состоящего из двух связанных дисульфидом фрагментов. Меньший из таких фрагментов называют F2, и он происходит из N-концевой части предшественника F0. Специалистам в данной области будет понятно, что сокращения F0, F1 и F2 в научной литературе обычно приведены в виде F₀, F₁ и F₂. Более крупный C-концевой фрагмент F₁ закоривает F-белок в мембране посредством последовательности из гидрофобных аминокислот, которая расположена рядом с 24-аминокислотным цитоплазматическим хвостом. Три димера F₂-F₁ подвергаются ассоциации с образованием зрелого F-белка, который принимает метастабильную предфьюзогенную конформацию ("конформацию перед слиянием"), в которой при контакте с мембраной клетки-мишени инициируется конформационное изменение. Конформационное изменение приводит к экспонированию гидрофобной последовательности, известной как пептид

слияния, которая подвергается ассоциации с мембраной клетки-хозяина и стимулирует слияние мембраны вируса или инфицированной клетки с мембраной клетки-мишени.

Фрагмент F_1 содержит по меньшей мере два гептадных повторяющихся домена, называемых HRA и HRB, которые расположены в непосредственной близости от пептида слияния и трансмембранных якорных доменов соответственно. В имеющейся перед слиянием конформации димер F_2 - F_1 образует структуру глобулярной головки и стебля, в которой домены HRA находятся в сегментированной (вытянутой) конформации в глобулярной головке. Напротив, домены HRB образуют трехнитевую спиральный стебель, выходящий из области головки. Во время перехода от имеющейся перед слиянием конформации в конформацию после слияния домены HRA сворачиваются и оказываются в непосредственной близости с доменами HRB с образованием узла из шести антипараллельных спиралей. В состоянии после слияния пептид слияния и трансмембранные домены располагаются рядом, облегчая слияние с мембраной.

Хотя приведенное выше описание конформации основано на молекулярном моделировании кристаллографических данных, структурные различия между конформациями перед слиянием и после слияния можно наблюдать, не прибегая к кристаллографии. Например, можно использовать электронную микроскопию, чтобы различать конформации перед слиянием и после слияния (альтернативно называемые предфьюзогенной и фьюзогенной), как показано в публикациях Calder с соавт. (*Virology*, 271: 122-131 (2000)) и Morton с соавт. (*Virology*, 311: 275-288), которые включены в настоящее описание в виде ссылки с целью предоставления технических инструкций. Конформацию перед слиянием также можно отличить от фьюзогенной конформации (конформации после слияния) с использованием анализов ассоциации липосом, как описано в публикации Connolly с соавт. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 17903-17908 (2006)), которая также включена в настоящее описание с целью предоставления технических инструкций. Кроме того, конформацию перед слиянием и фьюзогенную конформацию можно отличить с использованием антител (например, моноклональных антител), которые специфично узнают конформационные эпитопы, присутствующие в одной или другой форме F-белка PCV: форме перед слиянием или фьюзогенной форме, но отсутствуют во второй форме. Такие конформационные эпитопы могут быть следствием предпочтительного экспонирования антигенной детерминанты на поверхности молекулы. Альтернативно, конформационные эпитопы могут возникать в результате сближения аминокислот, которые не являются соседними в линейном полипептиде.

Антигены PreF, описанные в настоящей публикации, сконструированы для стабилизации и поддержания имеющейся перед слиянием конформации F-белка PCV так, чтобы в популяции экспрессированного белка значительная часть популяции экспрессированного белка была в предфьюзогенной конформации (конформации перед слиянием) (например, как рассчитано при структурном и/или термодинамическом моделировании или как оценено одним или несколькими способами, описанными выше). Стабилизирующие модификации вводят в нативный (или синтетический) F-белок, такой как иллюстративный F-белок с последовательностью SEQ ID NO:2, так, чтобы основные иммуногенные эпитопы конформации, имеющейся перед слиянием F-белка, сохранились после введения антигена PreF в клеточную или внеклеточную среду (например, *in vivo*, например, после введения пациенту).

Во-первых, гетерологичный стабилизирующий домен может быть помещен на C-конце конструкции, чтобы заменить заякоривающий в мембране домен полипептида F_0 . Предполагается, что стабилизирующий домен компенсирует нестабильность HRB, помогая стабилизировать конформер перед слиянием. В иллюстративных вариантах гетерологичный стабилизирующий домен представляет собой домен мультимеризации белка. Одним особенно предпочтительным примером такого домена мультимеризации белка является домен тримеризации. Иллюстративные домены тримеризации укладываются в суперспираль, которая стимулирует сборку в тримеры нескольких полипептидов, имеющих такие суперспирализованные домены. Одним предпочтительным примером домена тримеризации является изолейциновая молния. Примером домена изолейциновой молнии является сконструированный изолейциновый вариант GCN4 дрожжей, описанный Harbury с соавт. (*Science* 262: 1401-1407 (1993)). Последовательность одного подходящего домена изолейциновой молнии показана в SEQ ID NO:11, хотя в равной мере подходящими являются варианты такой последовательности, которые сохраняют способность образовывать суперспирализованный стабилизирующий домен. Альтернативные стабилизирующие суперспирализованные домены тримеризации включают TRAF2 (GENBANK®, номер доступа Q12933 [gi:23503103]; аминокислоты 299-348); тромбоспондин 1 (номер доступа P07996 [gi:135717]; аминокислоты 291-314); матрилин-4 (номер доступа 095460 [gi: 14548117]; аминокислоты 594-618; CMP (матрилин-1) (номер доступа NP 002370 [gi:4505111]; аминокислоты 463-496; HSF1 (номер доступа AAX42211 [gi:61362386]; аминокислоты 165-191 и кубулин (номер доступа NP_001072 [gi:4557503]; аминокислоты 104-138. Предполагается, что подходящий домен тримеризации приводит к сборке значительной части экспрессированного белка в тримеры. Например, по меньшей мере 50% рекомбинантного полипептида PreF, имеющего домен тримеризации, будет собираться в тример (например, как оценено с использованием AFF-MALS). Обычно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно 75% или больше экспрессированного полипептида существует в виде тримера.

Чтобы еще больше стабилизировать HRB, остаток лейцина, находящийся в положении 512 (относительно нативного белка F_0) PreF, может быть заменен лизином (L482K иллюстративного полипептида

антигена PreF с последовательностью SEQ ID NO:6). Такая замена улучшает периодичность гидрофобных остатков в суперспирали. Подобным образом, лизин может быть добавлен после аминокислоты в положении 105.

Во-вторых, пер27 может быть удален. Анализ структурной модели F-белка РСВ в состоянии перед слиянием свидетельствует, что пер27 образует большую естественную петлю между F1 и F2. Такая петля не вносит вклад в стабилизацию состояния перед слиянием и удаляется после расщепления нативного белка фурином.

В-третьих, могут быть удалены один или оба мотива расщепления фурином. В случае такой конструкции пептид слияния не отщепляется от F2, предотвращая высвобождение из глобулярной головки конформера, существующего перед слиянием, и доступность для расположенных рядом мембран. Взаимодействие между пептидом слияния и границей контакта мембран, как предполагают, является основной проблемой, связанной с нестабильностью состояния перед слиянием. Во время процесса слияния взаимодействие между пептидом слияния и мембраной-мишенью приводит к экспонированию пептида слияния из структуры глобулярной головки, усиливая нестабильность состояния перед слиянием и укладку в конформер, характерный для состояния после слияния. Такое изменение конформации обеспечивает процесс слияния с мембраной. Удаление одного или обоих сайтов расщепления фурином предположительно препятствует доступности мембраны для N-концевой части пептида слияния, стабилизируя состояние, имеющееся перед слиянием. Таким образом, в иллюстративных вариантах, описанных в настоящей публикации, удаление мотивов расщепления фурином приводит к образованию антигена PreF, который содержит интактный пептид слияния, который не отщепляется фурином во время или после процессинга и сборки.

Необязательно также может быть удален по меньшей мере один нефуриновый сайт расщепления, например, в результате замены одной или нескольких аминокислот. Например, экспериментальные данные свидетельствуют, что в условиях, благоприятных для расщепления некоторыми металлопротеиназами, антиген PreF может быть расщеплен в области аминокислот 110-118 (например, в результате расщепления, происходящего между аминокислотами 112 и 113 антигена PreF; между лейцином в положении 142 и глицином в положении 143 эталонного полипептида F-белка с последовательностью SEQ ID NO:2). Соответственно модификация одной или нескольких аминокислот в данной области может уменьшать расщепление антигена PreF. Например, лейцин в положении 112 может быть заменен другой аминокислотой, такой как изолейцин, глутамин или триптофан (как показано в иллюстративном варианте SEQ ID NO:20). Альтернативно или дополнительно, глицин в положении 113 может быть заменен серином или аланином.

Необязательно антиген PreF может содержать одну или несколько модификаций, которые изменяют картину или статус гликозилирования (например, благодаря увеличению или уменьшению доли молекул, гликозилированных в одном или нескольких сайтах гликозилирования, присутствующих в нативном полипептиде F-белка). Например, нативный полипептид F-белка с последовательностью SEQ ID NO:2 предположительно гликозилирован в положениях аминокислот 27, 70 и 500 (соответствующих положениям 27, 70 и 470 иллюстративного антигена PreF с последовательностью SEQ ID NO:6). В одном варианте модификацию вводят в области сайта гликозилирования в положении аминокислоты 500 (обозначаемом N470). Например, сайт гликозилирования может быть удален заменой аминокислотой, такой как глутамин (Q), вводимой вместо аспарагина в положении 500 (эталонной последовательности, которое соответствует при выравнивании положению 470 иллюстративного антигена PreF). Предпочтительно вводят модификацию, которая повышает эффективность гликозилирования в данном сайте гликозилирования. Примеры подходящих модификаций включают следующие аминокислотные последовательности в положениях 500-502: NGS; NKS; NGT; NKT. Интересно, что, как было обнаружено, модификации в таком сайте гликозилирования, которые приводят к усиленному гликозилированию, также приводят к значимо повышенному получению PreF. Таким образом, в некоторых вариантах антигены PreF имеют модифицированный сайт гликозилирования в положении, соответствующем аминокислоте 500 в эталонной последовательности PreF (SEQ ID NO:2), например в положении 470 антигена PreF, показанного в виде последовательности SEQ ID NO:6. Подходящие модификации включают последовательности: NGS; NKS; NGT; NKT в аминокислотах, соответствующих положениям 500-502 эталонной последовательности полипептида F-белка. Аминокислота иллюстративного варианта, который включает модификацию "NGT", приведена в последовательности SEQ ID NO:18. Специалист в данной области легко может определить сходные модификации в случае соответствующих модификаций NGS, NKS и NKT. Такие модификации предпочтительно сочетают с любой из стабилизирующих мутаций, описанных в настоящей публикации (например, гетерологичной суперспиралью, такой как изолейциновая молния, доменом и/или модификацией в гидрофобной области и/или удалением пер27 и/или удалением сайта расщепления фурином, и/или удалением нефуринового сайта расщепления, и/или удалением нефуринового сайта расщепления). Например, в одном конкретном варианте антиген PreF содержит замену, которая исключает нефуриновый сайт расщепления, и модификацию, которая увеличивает гликозилирование. Пример последовательности приведен в SEQ ID NO:22 (указанный иллюстративный вариант включает модификацию "NGT" и замену глутамином аминокислоты лейцина в положении 112).

В более общем смысле любую из стабилизирующих модификаций, описанных в настоящей публикации, например добавление гетерологичного стабилизирующего домена, такого как суперспираль (например, домен изолейциновой молнии), предпочтительно расположенную на С-конце растворимого антигена PreF; модификацию остатка, такую как замену лейцина на лизин, в гидрофобном домене HRB; удаление pep27; удаление одного или обоих мотивов расщепления фурином; удаление нефуринового сайта расщепления и/или модификацию сайта гликозилирования, можно использовать в сочетании с любой одной или несколькими (или вплоть до всех любых требуемых сочетаний) другими стабилизирующими модификациями. Например, гетерологичную суперспираль (или другой гетерологичный стабилизирующий домен) можно использовать отдельно или в сочетании с любой из следующих модификаций: модификацией в гидрофобной области и/или удалением pep27 и/или удалением сайта расщепления фурином, и/или удалением нефуринового сайта расщепления, и/или удалением нефуринового сайта расщепления. В некоторых конкретных вариантах антиген PreF содержит С-концевой суперспирализованный домен (изолейциновую молнию), стабилизирующую замену в гидрофобном домене HRB и удаление одного или обоих сайтов расщепления фурином. Такой вариант включает интактный пептид слияния, который не удаляется при расщеплении фурином. В одном конкретном варианте антиген PreF также содержит модифицированный сайт гликозилирования в положении аминокислоты 500.

Нативный полипептид F-белка может быть выбран из любого F-белка штамма РСВ А или РСВ В или из их вариантов (которые определены выше). В некоторых иллюстративных вариантах полипептид F-белка представляет собой F-белок, представленный последовательностью SEQ ID NO:2. Чтобы облегчить понимание настоящего описания, все положения аминокислотных остатков, независимо от штамма приведены относительно (то есть положение остатка аминокислоты соответствует) положения аминокислоты в иллюстративном F-белке. Сопоставимые положения аминокислот в любом другом штамме РСВ А или В легко могут быть определены специалистами в данной области посредством выравнивания аминокислотных последовательностей выбранного штамма РСВ с иллюстративной последовательностью с использованием легко доступных и хорошо известных алгоритмов выравнивания (таких как BLAST, например, с использованием параметров по умолчанию). Многочисленные дополнительные примеры полипептидов F-белка из разных штаммов РСВ описаны в публикации WO 2008114149 (которая включена в настоящее описание в виде ссылки с целью приведения дополнительных примеров последовательностей F- и G-белков РСВ). Дополнительные варианты могут возникать в результате дрейфа генов или могут быть получены искусственно с использованием сайт-специфичного или случайного мутагенеза или в результате рекомбинации двух или более ранее существующих вариантов. Такие дополнительные варианты также являются применимыми в контексте антигенов PreF (и PreF-G), описанных в настоящей публикации.

При выборе доменов F2 и F1 F-белка специалисту в данной области будет понятно, что нет строгой необходимости в том, чтобы включать полный домен F2 и/или F1. Обычно конформационные расчеты имеют значение при выборе подпоследовательности (или фрагмента) домена F2. Таким образом, домен F2 обычно содержит часть домена F2, который способствует сборке и стабильности полипептида. В некоторых иллюстративных вариантах домен F2 включает аминокислоты 26-105. Однако также возможны варианты, имеющие небольшие по длине модификации (в результате добавления или делеции одной или нескольких аминокислот).

Обычно выбирают и конструируют, по меньшей мере, подпоследовательность (или фрагмент) домена F1, чтобы поддерживать стабильную конформацию, которая включает иммунодоминантные эпитопы F-белка. Например, обычно требуется выбор подпоследовательности полипептидного домена F1, который содержит эпитопы, узнаваемые нейтрализующими антителами, в областях аминокислот 262-275 (нейтрализация паливизумабом) и 423-436 (мАт ch101F Centocor). Кроме того, желательно включение Т-клеточных эпитопов, например, в области аминокислот 328-355, чаще всего в виде одной непрерывной части субъединицы F1 (например, охватывающей аминокислоты 262-436), но эпитопы могут содержаться в синтетической последовательности, которая включает такие иммунодоминантные эпитопы в виде прерывистых элементов, собранных в стабильную конформацию. Таким образом, полипептид домена F1 содержит, по меньшей мере, примерно аминокислоты 262-436 полипептида F-белка РСВ. В одном не ограничивающем примере, предлагаемом в настоящем описании, домен F1 содержит аминокислоты 137-516 нативного полипептида F-белка. Специалисту в данной области будет понятно, что можно использовать дополнительные более короткие подпоследовательности на усмотрение специалиста-практика.

При выборе подпоследовательности домена F2 или F1 (или как будет обсуждаться ниже в отношении G-белкового компонента некоторых антигенов PreF-G) в дополнение к оценке конформации может быть желательно выбрать последовательности (например, варианты, подпоследовательности и тому подобное) на основе включения дополнительных иммуногенных эпитопов. Например, дополнительные Т-клеточные эпитопы могут быть идентифицированы с использованием якорных мотивов или другими способами, такими как использование нейронной сети или полиномиальные определения, известные в данной области, см., например, RANKPEP (доступный на сайте в Интернете: mif.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html); ProPredI (доступный на сайте в Интернете: imtech.res.in/raghava/propredl/index.html); Vimas (доступный на сайте в Интернете: [- 12 -](http://www-</p>
</div>
<div data-bbox=)

bimas.dcrn.nih.gov/molbi/hla_bind/index.html) и SYFPEITH (доступный на сайте в Интернете: syfpeithi.bmi-heidelberg.com/scripts/MHCServer.dll/home.htm). Например, алгоритмы используют для определения "порога связывания" пептидов и для их выбора с оценками, которые свидетельствуют о высокой вероятности их связывания с МНС или антителами с определенной аффинностью. Алгоритмы основаны либо на влиянии на связывание МНС конкретной аминокислоты в конкретном положении, либо на влиянии на связывание антител конкретной аминокислоты в конкретном положении, либо на влиянии на связывание конкретной замены в содержащем мотив пептиде. В контексте иммуногенного пептида "консервативным остатком" является остаток, который встречается со значительно более высокой частотой, чем можно ожидать при случайном распределении, в конкретном положении в пептиде. Якорные остатки являются консервативными остатками, которые обеспечивают точку контакта с молекулой МНС. Т-клеточные эпитопы, идентифицированные такими прогностическими способами, могут быть подтверждены благодаря измерению их связывания со специфичным белком МНС и на основании их способности стимулировать Т-клетки в случае представления в контексте белка МНС.

Предпочтительно антигены PreF (включая антигены PreF-G, которые обсуждаются ниже) содержат сигнальный пептид, соответствующий системе экспрессии, например сигнальный пептид млекопитающего или вируса, такой как нативная сигнальная последовательность F₀ PCB (например, аминокислоты 1-25 последовательности SEQ ID NO:2 или аминокислоты 1-25 последовательности SEQ ID NO:6). Обычно сигнальный пептид выбирают так, чтобы он был совместим с клетками, выбранными для экспрессии рекомбинантов. Например, сигнальный пептид (такой как бакуловирусный сигнальный пептид или сигнальный пептид мелиттина), может быть заменен для экспрессии в клетках насекомых. Подходящие сигнальные пептиды растений известны в данной области, если предпочтительна система экспрессии растений. В данной области известны многочисленные примеры сигнальных пептидов (см., например, Zhang and Henzel, *Protein Sci.*, 13: 2819-2824 (2004), где описаны многочисленные сигнальные пептиды человека), которые систематизированы, например, в базе данных о сигнальных пептидах SPdb, в которую включены сигнальные последовательности архебактерий, прокариоты и эукариоты (<http://proline.bic.nus.edu.sg/spdb/>). Необязательно любой из ранее указанных антигенов может содержать дополнительную последовательность или метку, такую как His-метка, для облегчения очистки.

Необязательно антиген PreF может содержать дополнительные иммуногенные компоненты. В некоторых особенно предпочтительных вариантах антиген PreF включает антигенный компонент G-белка PCB. Примеры химерных белков, имеющих PreF и G-компонент, включают PreF_V1 (представленный последовательностями SEQ ID NO: 7 и 8) и PreF_V2 (представленный последовательностями SEQ ID NO: 9 и 10).

В антигенах PreF-G антигенную часть G-белка (например, укороченного G-белка, такого как белок, состоящий из аминокислотных остатков 149-229) добавляют к С-концу конструкции. Обычно G-белковый компонент связывают с компонентом F-белка через гибкую линкерную последовательность. Например, в иллюстративной конструкции PreF_V1 G-белок связан с компонентом PreF линкером -GGSGGSGGS- (SEQ ID NO:14). В конструкции PreF_V2 линкер является более коротким. Вместо наличия линкера -GGSGGSGGS- (SEQ ID NO:14) PreF_V2 содержит 2 глицина (-GG-) в качестве линкера.

В случае присутствия домен полипептида G-белка может содержать весь или часть G-белка, выбранного из любого штамма PCB A или PCB B. В некоторых иллюстративных вариантах G-белок представляет собой G-белок, представленный последовательностью SEQ ID NO:4 (или на 95% идентичен ему). Дополнительные примеры подходящих последовательностей G-белка можно найти в публикации WO 2008114149 (которая включена в настоящее описание в виде ссылки).

Полипептидный компонент G-белка выбирают так, чтобы он содержал, по меньшей мере, подпоследовательность (или фрагмент) G-белка, который сохраняет иммунодоминантный Т-клеточный эпитоп(пы), например, в области аминокислот 183-197, например фрагменты G-белка, которые включают аминокислоты 151-229, 149-229 или 128-229 нативного G-белка. В одном иллюстративном варианте полипептид G-белка представляет собой подпоследовательность (или фрагмент) нативного полипептида G-белка, который включает все или часть аминокислотных остатков 149-229 нативного полипептида G-белка. Специалисту в данной области будет понятно, что также можно использовать более длинные или более короткие части G-белка при условии, что выбранная часть конформационно не дестабилизирует или не нарушает экспрессию, фолдинг или процессинг антигена PreF-G. Необязательно домен G-белка содержит аминокислотную замену в положении 191, которое, как было показано ранее, вовлечено в снижение и/или предотвращение усиленного заболевания, характеризуемого эозинофилией, ассоциированного с инактивированными формалином PCB-вакцинами. Подробное описание свойств, встречающихся в природе и имеющих замены (N191A) G-белков, можно найти, например, в публикации патента США № 2005/0042230, которая включена в настоящее описание в виде ссылки.

Например, что касается выбора последовательностей, соответствующих встречающимся в природе штаммам, то один или несколько доменов могут соответствовать по последовательности штамму PCB A или B, таким как обычные лабораторные изоляты, обозначаемые A2 или Long, или любой другой встречающийся в природе штамм или изолят (которые описаны в упоминаемой выше публикации WO 2008114149). Кроме таких встречающихся в природе и выделенных вариантов также можно использо-

вать сконструированные варианты, которые обладают сходством последовательности с вышеуказанными последовательностями, в контексте антигенов PreF (включая PreF-G). Специалистам в данной области будет понятно, что сходство между полипептидами антигена PreF (и полинуклеотидными последовательностями, которые описаны ниже), как и в случае полипептидов (и нуклеотидных последовательностей, в общем), может быть выражено в виде сходства между последовательностями, иначе называемого идентичностью последовательностей. Идентичность последовательностей часто измеряют в виде процента идентичности (или сходства); чем выше процент, тем более сходны первичные структуры двух последовательностей. В общем, чем больше сходство первичных структур двух аминокислотных (или полинуклеотидных) последовательностей, тем более сходны структуры более высокого порядка, образуемые в результате фолдинга и сборки. Варианты полипептидных (и полинуклеотидных) последовательностей PreF обычно имеют одну или небольшое количество аминокислотных делеций, добавлений или замен, но, тем не менее, могут иметь очень высокий процент общих аминокислотных и обычно их полинуклеотидных последовательностей. Более того, варианты сохраняют структурные и, следовательно, конформационные свойства эталонных последовательностей, описанных в настоящей публикации.

Способы определения идентичности последовательностей хорошо известны в данной области и применимы к полипептидам антигенов PreF, а также нуклеиновым кислотам, которые их кодируют (например, которые описаны ниже). Различные программы и алгоритмы выравнивания описаны в Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Higgins and Sharp, *Gene* 73:237, 1988; Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151, 1989; Corpet et al., *Nucleic Acids Research* 16:10881, 1988 и Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988. В публикации Altschul с соавт. (*Nature Genet.* 6: 119, 1994) приведено подробное рассмотрение способов выравнивания последовательностей и вычисления гомологии. Основное средство поиска, основанное на локальных выравниваниях NCBI (BLAST) (Altschul с соавт. (*J. Mol. Biol.* 215: 403, 1990)), доступно из нескольких источников, включая Национальный центр биотехнологической информации (NCBI, Bethesda, MD), и в Интернете для использования применительно к программам анализа последовательностей blastp, blastn, blastx, tblastn и tblastx. Описание того, как определить идентичность последовательностей с использованием такой программы, доступно на веб-сайте NCBI в Интернете.

В некоторых случаях антигены PreF имеют одну или несколько аминокислотных модификаций по сравнению с аминокислотной последовательностью встречающегося в природе штамма, из которого она получена (например, в дополнение к указанным выше стабилизирующим модификациям). Такие различия могут представлять собой добавление, делецию или замену одной или нескольких аминокислот. Вариант обычно отличается не более чем примерно на 1 или 2, или 5, или 10, или 15, или 20% аминокислотных остатков. Например, вариант полипептидной последовательности антигена PreF (включая PreF-G) может содержать 1 или 2, или до 5, или примерно до 10, или примерно до 15, или примерно до 50, или примерно до 100 аминокислотных различий по сравнению с иллюстративными полипептидными последовательностями антигенов PreF SEQ ID NO:6, 8, 10, 18, 20 и/или 22. Таким образом, вариант в контексте F- или G-белка PCB или антигена PreF (включая антиген PreF-G) обычно имеет по меньшей мере 80 или 85%, чаще по меньшей мере примерно 90% или больше, например 95, или даже 98, или 99% идентичность последовательности с эталонным белком, например с эталонными последовательностями, показанными в SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 18, 20 и/или 22, или любыми иллюстративными антигенами PreF, описанными в настоящей публикации. Дополнительными вариантами, включенными в качестве отличительного признака настоящего изобретения, являются антигены PreF (включая антигены PreF-G), которые содержат всю или часть нуклеотидной или аминокислотной последовательности, выбранной из встречающихся в природе вариантов, описанных в WO 2008114149. Дополнительные варианты могут возникать в результате дрейфа генов или могут быть получены искусственно с использованием сайт-специфичного или случайного мутагенеза, или в результате рекомбинации двух или более ранее существующих вариантов. Такие дополнительные варианты также применимы в контексте антигенов PreF (и PreF-G), описанных в настоящей публикации. Например, модификация может представлять собой замену одной или нескольких аминокислот (например, двух аминокислот, трех аминокислот, четырех аминокислот, пяти аминокислот, примерно до десяти аминокислот или больше), которые не изменяют конформацию или иммуногенные эпитопы полученного в результате антигена PreF.

Альтернативно или дополнительно, модификация может включать делецию одной или нескольких аминокислот и/или добавление одной или нескольких аминокислот. Действительно, при желании один или несколько полипептидных доменов могут представлять собой синтетический полипептид, который не соответствует никакому отдельному штамму, но содержит подпоследовательности компонентов из многих штаммов или даже из консенсусной последовательности, вычисленной в результате выравнивания множества штаммов полипептидов вируса РСВ. В некоторых вариантах один или несколько полипептидных доменов модифицируют добавлением аминокислотной последовательности, которая составляет метку, которая облегчает последующую обработку или очистку. Такая метка может быть антигенной или эпитопной меткой, ферментативной меткой или полигистидиновой меткой. Обычно метка расположена на одном или на другом конце белка, например на С-конце или N-конце антигена или белка слияния.

Нуклеиновые кислоты, которые кодируют антигены PreF.

Другой аспект настоящего изобретения касается рекомбинантных нуклеиновых кислот, которые кодируют антигены PreF, которые описаны выше. Более точно такие нуклеиновые кислоты кодируют полипептиды, которые включают растворимый пептидный антиген F-белка, который содержит домен F2 и домен F1 полипептида F-белка PCB, который имеет по меньшей мере одну модификацию, выбранную из (i) добавления аминокислотной последовательности, содержащей гетерологичный домен тримеризации; (ii) делеции по меньшей мере одного сайта расщепления фурином; (iii) делеции по меньшей мере одного нефуринового сайта расщепления; (iv) делеции одной или нескольких аминокислот домена pep27 и (v) по меньшей мере одной замены или добавления гидрофильной аминокислоты в гидрофобный домен внеклеточного домена F-белка. Необязательно такой полинуклеотид кодирует антиген PreF с модификацией в сайте гликозилирования. Природа и структурные особенности таких полипептидов подробно описаны выше. Специалист в данной области легко сможет определить нуклеотидные последовательности, которые кодируют любую и все описанные полипептидные последовательности, на основе приведенных в настоящем описании инструкций, включая примеры последовательностей, приведенные в списке последовательностей, и включенные иным образом (например, благодаря включению в виде ссылки) в настоящее описание.

В некоторых вариантах рекомбинантные нуклеиновые кислоты оптимизированы по кодонам для экспрессии в выбранной прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Например, последовательности SEQ ID NO:5, 12, 17, 19 и 21 являются разными иллюстративными не ограничивающими примерами последовательностей, которые кодируют антиген PreF, которые оптимизированы по кодонам для экспрессии в клетках млекопитающих, например CHO. Чтобы облегчить репликацию и экспрессию, нуклеиновые кислоты могут быть включены в вектор, такой как прокариотический или эукариотический экспрессирующий вектор. Клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие рекомбинантный антиген PreF, также являются отличительным признаком настоящего изобретения.

Предпочтительные клетки-хозяева включают прокариотические (т.е. бактериальные) клетки-хозяева, такие как *E. coli*, а также многочисленные эукариотические клетки-хозяева, включая клетки грибов (например, дрожжей), клетки насекомых и клетки млекопитающих (такие как клетки CHO, VERO и HEK293).

Чтобы облегчить репликацию и экспрессию, нуклеиновые кислоты могут быть включены в вектор, такой как прокариотический или эукариотический экспрессирующий вектор. Хотя нуклеиновые кислоты, описанные в настоящей публикации, могут быть включены в любой из множества векторов (включая, например, бактериальные плазмиды; фаговую ДНК; бакуловирус; дрожжевые плазмиды; векторы, полученные в результате комбинирования плазмид и фаговой ДНК, вирусную ДНК, такую как вирус осповакцины, аденовирус, поксвирус птиц, вирус псевдобешенства, аденовирус, аденоассоциированный вирус, ретровирусы и многие другие), чаще всего вектором будет являться экспрессирующий вектор, подходящий для образования полипептидных продуктов экспрессии. В экспрессирующем векторе нуклеиновая кислота, кодирующая антиген PreF, обычно расположена вблизи и в такой же ориентации, как и соответствующая последовательность регуляции транскрипции (промотор и, необязательно, один или несколько энхансеров) для управления синтезом мРНК. То есть представляющая интерес полинуклеотидная последовательность оперативно связана с подходящей последовательностью регуляции транскрипции. Примеры таких промоторов включают немедленный ранний промотор CMV, LTR или промотор SV40, промотор полиэдрина бакуловируса, промотор *lac* или *trp* *E. coli*, промотор фага T7 и промотор PL лямбда и другие промоторы, которые, как известно, контролируют экспрессию генов в прокариотических или эукариотических клетках или их вирусах. Экспрессирующий вектор обычно также содержит сайт связывания рибосомы для инициации трансляции и терминатор транскрипции. Вектор необязательно содержит подходящие последовательности для усиления экспрессии. Кроме того, экспрессирующие векторы необязательно содержат один или несколько селективируемых маркерных генов, обеспечивающих фенотипический признак для селекции трансформированных клеток-хозяев, таких как ген дигидрофолатредуктазы или резистентности к неомицину в случае культуры эукариотических клеток или таких как гены резистентности к канамицину, тетрациклину или ампициллину в случае *E. coli*.

Экспрессирующий вектор также может содержать дополнительные элементы экспрессии, например, для повышения эффективности трансляции. Такие сигналы могут включать, например, кодон инициации ATG и близлежащие последовательности. В некоторых случаях, например, кодон инициации трансляции и ассоциированные элементы последовательности встраивают в соответствующий экспрессирующий вектор одновременно с представляющей интерес полинуклеотидной последовательностью (например, нативный стартовый кодон). В таких случаях дополнительные сигналы регуляции трансляции не требуются.

Однако в тех случаях, когда встраивают только кодирующую полипептид последовательность или ее часть, то обеспечивают экзогенные сигналы регуляции трансляции, включая кодон инициации ATG, для трансляции нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген PreF. Кодон инициации помещают в правильной рамке считывания, чтобы гарантировать трансляцию представляющей интерес полинуклеотидной последовательности. Экзогенные транскрипционные элементы и кодоны инициации могут иметь

разное происхождение, как природное, так и синтетическое. При необходимости эффективность экспрессии может быть дополнительно повышена за счет включения энхансеров, подходящих для используемой клеточной системы (Scharf et al. (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20: 125-62; Bitter et al. (1987) *Methods in Enzymol.* 153: 516-544).

В некоторых случаях нуклеиновая кислота (такая как вектор), которая кодирует антиген PreF, включает один или несколько дополнительных элементов последовательности, выбранных для увеличения и/или оптимизации экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей PreF, при введении в клетку-хозяина. Например, в некоторых вариантах нуклеиновые кислоты, которые кодируют антиген PreF, включают интронную последовательность, такую как последовательность интрона вируса герпеса 5 человека (см., например, SEQ ID NO:13). Интроны, как неоднократно было показано, усиливают экспрессию гомологичных и гетерологичных нуклеиновых кислот, когда они соответствующим образом расположены в рекомбинантной конструкции. Другой класс усиливающих экспрессию последовательностей включает эпигенетический элемент, такой как участок прикрепления к матриксу (или MAR) или подобный эпигенетический элемент, например элементы STAR (например, такие как элементы STAR, описанные Otte с соавт. (*Biotechnol. Prog.* 23: 801-807, 2007)). Не вдаваясь в теорию, полагают, что MAR опосредуют заякоривание последовательности ДНК-мишени в ядерном матриксе, образуя домены петель хроматина, которые выступают из гетерохроматинового кодра. Хотя MAR не содержат никакой явной консенсусной или узнаваемой последовательности, их наиболее постоянным признаком, по-видимому, является высокое общее содержание А/Т и преобладание оснований С в одной нити. Такие области, по-видимому, образуют изогнутые вторичные структуры, которые могут быть склонны к разделению нитей, и могут включать элемент раскручивания кодра (CUE), который может служить в качестве точки нуклеации для разделения нитей. Несколько простых АТ-богатых мотивов последовательности были ассоциированы с последовательностями MAR: например, А-бокс, Т-бокс, мотивы раскручивания ДНК, сайты связывания SATB1 (Н-бокс, А/Т/С25) и консенсусные сайты топоизомеразы II позвоночных или *Drosophila*. Примеры последовательностей MAR описаны в опубликованной заявке на выдачу патента США № 20070178469 и в международной заявке на выдачу патента № WO 02/074969 (которые включены в настоящее описание в виде ссылки). Дополнительные последовательности MAR, которые можно использовать для усиления экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген PreF, включают MAR лизоцима кур, MARp1-42, MARp1-6, MARp1-68 и MARpx-29, описанные Girod с соавт. (*Nature Methods*, 4: 747-753, 2007) (раскрытые в GenBank с номерами доступа EA423306, DI107030, DI106196, DI107561 и DI106512 соответственно). Специалисту будет понятно, что экспрессию можно дополнительно модулировать посредством отбора MAR, которые обеспечивают промежуточный уровень усиления, как сообщалось для MAR 1-9. При необходимости альтернативные последовательности MAR для увеличения экспрессии антигена PreF могут быть идентифицированы в результате поиска в базах данных о последовательностях, например, с использованием компьютерной программы, такой как MAR-Finder (доступной на веб-сайте futuresoft.org/MarFinder), SMARTest (доступной на веб-сайте genomatix.de) или SMARScan I (Levitsky et al., *Bioinformatics* 15: 582-592, 1999). В некоторых вариантах MAR вводят (например, трансфицируют) в клетку-хозяина в той же нуклеиновой кислоте (например, векторе), что и последовательность, кодирующую антиген PreF. В альтернативном варианте MAR вводят в отдельной нуклеиновой кислоте (например, *in trans*), и он необязательно может коинтегрировать с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген PreF.

Примеры способов, достаточные в качестве руководства для специалиста в данной области при получении нуклеиновых кислот рекомбинантного антигена PreF, можно найти в публикациях Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Press, 2001; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1992 (and Supplements to 2003) и Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, 4th ed., Wiley & Sons, 1999.

Примеры нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды антигена PreF, представлены в SEQ ID NO:5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 и 21. Варианты, которые содержат модификацию в сайте гликозилирования, например в аминокислоте, соответствующей положению 500 в последовательности SEQ ID NO:2, могут быть получены в результате изменения (например, мутации) нуклеотидов в области положений 1408-1414 (по сравнению, например, с полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:12, например, SEQ ID NO:17 и 21). Подходящие последовательности нуклеотидов для кодирования вариантов по гликозилированию (например, которые повышают эффективность гликозилирования) включают aacgggt, aacaagt, aacggga и aacaaga. Также возможны альтернативные последовательности, такие как cagcagt, которые исключают сайт гликозилирования. Дополнительные варианты могут быть получены при сборке аналогичных полипептидных последовательностей F- и G-белков, выбранных из любых известных (или впоследствии открытых) штаммов РСВ, например, как описано в WO 2008114149. Дополнительные варианты последовательности, которые обладают идентичностью последовательности с иллюстративными вариантами, могут быть получены специалистами в данной области. Как правило, варианты нуклеиновых кислот будут кодировать полипептиды, которые отличаются не более чем на 1 или 2, или 5, или 10,

или 15, или 20% по аминокислотным остаткам. То есть кодируемые полипептиды обладают по меньшей мере 80 или 85%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 90% или больше, например 95 или даже 98 или 99% идентичностью последовательностей. Специалистам в данной области будет сразу же понятно, что полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды PreF, сами по себе могут иметь меньшую идентичность последовательностей вследствие избыточности генетического кода. В некоторых случаях антигены PreF имеют одну или несколько модификаций аминокислот по сравнению с аминокислотной последовательностью встречающегося в природе штамма, из которого он получен (например, в дополнение к указанным выше стабилизирующим модификациям). Такие отличия могут представлять собой добавление, делецию или замену одного или нескольких нуклеотидов или аминокислот соответственно. Вариант обычно отличается не более чем примерно на 1 или 2, или 5, или 10, или 15, или 20% остатков нуклеотидов. Например, нуклеиновая кислота варианта антигена PreF (включая PreF-G) может содержать 1 или 2, или до 5, или примерно до 10, или примерно до 15, или примерно до 50, или примерно до 100 отличий нуклеотидов по сравнению с иллюстративными нуклеиновыми кислотами антигена PreF с последовательностями SEQ ID NO:5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 и/или 21. Таким образом, вариант в контексте F- или G-белка PCB или нуклеиновой кислоты антигена PreF (включая антиген PreF-G антиген) обычно обладает по меньшей мере 80 или 85%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 90% или больше, например 95 или даже 98 или 99% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью, например эталонными последовательностями, показанными в SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 и/или 21, или любой другой из иллюстративных нуклеиновых кислот антигена PreF, описанных в настоящей публикации. Дополнительные варианты, включенные в качестве отличительного признака настоящего изобретения, представляют собой антигены PreF (включая антигены PreF-G), которые включают всю или часть нуклеотидной последовательности, выбранной из встречающихся в природе вариантов, описанных в WO 2008114149. Дополнительные варианты могут возникать в результате дрейфа генов или могут быть получены искусственно с использованием сайт-специфичного или случайного мутагенеза или в результате рекомбинации двух или более ранее существующих вариантов. Такие дополнительные варианты также являются подходящими в контексте антигенов PreF (и PreF-G), описанных в настоящей публикации.

Кроме вариантов нуклеиновых кислот, описанных ранее, также можно использовать нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются с одной или несколькими иллюстративными нуклеиновыми кислотами, представленными в SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 и/или 21, для кодирования антигенов PreF. Специалисту в данной области будет понятно, что в дополнение к измерению идентичности последовательностей в %, обсуждаемому выше, другим показателем сходства последовательностей между двумя нуклеиновыми кислотами является способность к гибридизации. Чем более сходными являются последовательности двух нуклеиновых кислот, тем более жесткими являются условия, в которых они будут гибридизоваться. Жесткость условий гибридизации зависит от последовательности и различна при разных параметрах окружающей среды. Таким образом, условия гибридизации, приводящие к конкретной степени жесткости, будут варьировать в зависимости от природы выбранного способа гибридизации и от состава и длины гибридизующихся последовательностей нуклеиновых кислот. В общем, температура гибридизации и ионная сила (особенно концентрация Na^+ и/или Mg^+) буфера для гибридизации будут определять жесткость гибридизации, хотя количество промывок также влияет на жесткость. В общем, условия жесткости выбирают так, чтобы были примерно на 5-20°C ниже, чем температура плавления (T_m) для конкретной последовательности при определенной ионной силе и pH. T_m означает температуру (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% последовательности-мишени гибридизуется с точно совпадающим зондом. Условия для гибридизации нуклеиновых кислот и расчет жесткости можно найти, например, в публикациях Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Tijssen, *Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I: Theory and Nucleic Acid Preparation*, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Ltd., NY, NY, 1993 и Ausubel et al. *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999.

В целях настоящего описания термин "условия жесткости" охватывает условия, в которых гибридизация будет происходить только, если существует менее чем 25% ошибочных спариваний между гибридизующейся молекулой и последовательностью-мишенью. "Условия жесткости" можно подразделить на конкретные уровни жесткости для более точного определения. Таким образом, в используемом в настоящем описании смысле условия "умеренной жесткости" представляют собой условия, в которых молекулы с несоответствием более чем 25% последовательностей не будут гибридизоваться; условия "средней жесткости" представляют собой условия, в которых молекулы с несоответствием более чем на 15% не будут гибридизоваться, и условия "высокой жесткости" представляют собой условия, в которых последовательности с несоответствием более чем на 10% не будут гибридизоваться. Условиями "очень высокой жесткости" являются условия, в которых последовательности с несоответствием более чем на 6% не будут гибридизоваться. Напротив, нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в условиях "низкой жесткости", включают нуклеиновые кислоты с намного меньшей идентичностью последовательностей или с идентичностью последовательностей на протяжении только коротких подпоследова-

тельностей нуклеиновой кислоты. Поэтому будет понятно, что различные варианты нуклеиновых кислот, которые входят в объем настоящего изобретения, способны гибридизоваться по меньшей мере с одной из последовательностей SEQ ID NO:1, 3, 5, 1, 9, 12, 13, 17, 19 и/или 21 на протяжении, по существу, их полной длины.

Способы получения антигенных полипептидов РСВ.

Антигены PreF (включая антигены PreF-G, а также в соответствующих случаях антигены G), описанные в настоящей публикации, получают, используя хорошо разработанные способы экспрессии и очистки рекомбинантных белков. Способы, достаточные в качестве руководства для специалиста в данной области, можно найти в следующих публикациях: Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 200 и Ausubel et al. *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., 999. Дополнительные и конкретные подробности приведены в настоящем описании ниже.

Рекомбинантные нуклеиновые кислоты, которые кодируют антигены PreF, вводят в клетки-хозяева любым из множества хорошо известных способов, таких как электропорация, опосредованная липосомами трансфекция (например, с использованием коммерчески доступного реагента для липосомной трансфекции, такой как липофектамин™ 2000 или трансфектин™), преципитации фосфатом кальция, инфекции, трансфекции и тому подобного, в зависимости от выбора векторов и клеток-хозяев. Примеры нуклеиновых кислот, которые кодируют антигены PreF (включая антигены PreF-G), приведены в SEQ ID NO:5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 и 21. Специалисту в данной области будет понятно, что последовательности SEQ ID NO:5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 и 21 являются иллюстративными и не предназначены для ограничения. Например, полинуклеотидные последовательности, которые кодируют такие же белки, как и последовательности SEQ ID NO:5, 7 и 9, (например, представленные последовательностями SEQ ID NO:6, 8 и 10), но которые отличаются только в связи с избыточностью генетического кода (например, в результате альтернативной оптимизации кодонов, как показано в SEQ ID NO:12), несомненно, можно использовать вместо иллюстративных последовательностей SEQ ID NO:5, 7, и 9. Это справедливо и в случае последовательностей SEQ ID NO:17, 19 и 21. Подобным образом можно использовать полинуклеотидные последовательности, которые содержат элементы, усиливающие экспрессию, такие как расположенные внутри интроны (или добавление промотора, энхансера, интрона или других сходных элементов), которые показаны в SEQ ID NO:13. Специалисту в данной области будет понятно, что также применимы сочетания таких модификаций. Подобным образом также можно использовать гомологичные последовательности, выбранные из любого штамма РСВ А или РСВ В, и/или другие последовательности, которые имеют значительную идентичность последовательностей, как обсуждалось выше, для экспрессии антигенов PreF. Действительно, любой из вариантов нуклеиновых кислот, описанных ранее, может быть соответствующим образом введен в клетки-хозяева и использован для получения антигенов PreF (включая антигены PreF-G) и в приемлемом случае полипептидов G.

Например, в некоторых случаях варианты нуклеиновых кислот модифицируют, чтобы изменить картину гликозилирования, например, как описано выше, заменой одной или нескольких аминокислот вблизи положения аминокислоты 500 (относительно последовательности SEQ ID NO:2, например SEQ ID NO:17). Было обнаружено, что модификация картины гликозилирования, например, в сочетании с модификацией сайта узнавания для расщепления повышает продукцию антигена PreF в культуре клеток. В таких случаях способы, описанные ниже, для экспрессии и выделения рекомбинантных антигенов PreF позволяют увеличивать продукцию антигена PreF за счет изменения картины гликозилирования антигена PreF в результате замены одной или нескольких аминокислот в сайте узнавания для гликозилирования, необязательно в сочетании с модификацией одного или нескольких сайтов расщепления (таких как сайт узнавания для расщепления нефуриновым ферментом или фурином), которые описаны выше.

Таким образом, клетки-хозяева, которые содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие рекомбинантный антиген PreF, также являются отличительным признаком настоящего изобретения. Предпочтительные клетки-хозяева включают прокариотические (т.е. бактериальные) клетки-хозяева, такие как *E. coli*, а также многочисленные эукариотические клетки-хозяева, включая клетки грибов (например, дрожжи, такие как *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*), клетки насекомых, клетки растений и клетки млекопитающих (включая клетки CHO и HEK293). Нуклеиновые кислоты рекомбинантных антигенов PreF вводят (например, трансдуцируют, трансформируют или трансфицируют) в клетки-хозяева, например, посредством вектора, такого как экспрессирующий вектор. Как описано выше, вектор чаще всего представляет собой плазмиду, но такие векторы также могут представлять собой, например, вирусную частицу, фаг и т.д. Примеры подходящих для экспрессии хозяев включают бактериальные клетки, такие как *E. coli*, *Streptomyces* и *Salmonella typhimurium*; клетки грибов, такие как *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* и *Neurospora crassa*; клетки насекомых, такие как *Drosophila* и *Spodoptera frugiperda*; клетки млекопитающих, такие как 3T3, COS, CHO, ВНК, HEK293 или меланомы Боуэса; клетки растений, включая клетки водорослей и т.д. В некоторых случаях можно использовать временно трансфицированные клетки, чтобы получить рекомбинантные антигены PreF. В некоторых вариантах отбирают клетки (например, клоны), которые имеют стабильно интегрированную нуклеиновую кислоту PreF, и используют для получения рекомбинантного антигена PreF.

Клетки-хозяева можно культивировать в обычной питательной среде, модифицированной соответствующим образом для активации промоторов, отбора трансформантов или амплификации встроенных полинуклеотидных последовательностей. Условия культивирования, такие как температура, pH и тому подобное, обычно представляют собой условия, ранее используемые для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и такие условия известны специалистам в данной области и описаны в публикациях, цитированных в настоящем описании, включая, например, Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, third edition, Wiley-Liss, New York, и приведенные в указанной публикации ссылки. Не обязательно клетки-хозяева культивируют в бессывороточной среде и/или в среде, не содержащей животных продуктов.

Продукты экспрессии, соответствующие нуклеиновым кислотам согласно изобретению, также могут быть получены в других клетках, отличных от клеток животных, таких как клетки растений, дрожжей, грибов, бактерий и тому подобных. В дополнение к публикациям Sambrook, Berger и Ausubel под редакцией, имеющее отношение к культивированию клеток, можно найти в публикациях Payne et al. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg and Phillips (eds) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods* Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) и Atlas and Parks (eds) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

В бактериальных системах может быть выбрано несколько экспрессирующих векторов в зависимости от предполагаемого применения экспрессированного продукта. Например, в случае необходимости больших количеств полипептида или его фрагментов для получения антител предпочтительно используют векторы, которые способствуют высоким уровням экспрессии слитых белков, которые можно легко очистить. Такие векторы включают без ограничения многофункциональные клонирующие и экспрессирующие векторы *E. coli*, такие как BLUESCRIPT (Stratagene), в которых представляющая интерес кодирующая последовательность, например полинуклеотид согласно изобретению, который описан выше, может быть лигирован в вектор в рамке с последовательностями для аминоконцевого иницирующего трансляцию метионина и последующих 7 остатков бета-галактозидазы с получением каталитически активного слитого белка бета-галактозидазы; векторы pIN (Van Heeke and Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 5503-5509). В некоторых примерах нуклеиновые кислоты вводят в клетки с помощью векторов, подходящих для введения и экспрессии в прокариотических клетках, например в клетках *E. coli*. Например, нуклеиновая кислота, включающая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует антиген PreF, может быть введена в любой из множества коммерчески доступных или запатентованных векторов, таких как серия экспрессирующих векторов pET (например, pET9b и pET2d). Экспрессия кодирующей последовательности индуцируется IPTG, приводя к высоким уровням экспрессии белка. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая антиген PreF, транскрибируется под контролем промотора фага T7. Также применимы альтернативные векторы, такие как pURV22, которые содержат индуцируемый нагреванием промотор pL лямбда.

Экспрессирующий вектор затем вводят (например, посредством электропорации) в подходящего бактериального хозяина. Имеются многочисленные подходящие штаммы *E. coli*, которые могут быть выбраны специалистом в данной области (например, штаммы Rosetta и BL21 (DE3), как было подтверждено, являются предпочтительными для экспрессии рекомбинантных векторов, содержащих полинуклеотидные последовательности, которые кодируют антигены PreF.

Подобным образом в дрожжах, таких как *Saccharomyces cerevisiae*, можно использовать ряд векторов, содержащих конститутивные или индуцируемые промоторы, такие как промоторы альфа-фактора, алкогольоксидазы и PGH, для получения требуемых продуктов экспрессии. Обзор смотри в публикациях Berger, Ausubel и, например, Grant с соавт. (1987; *Methods in Enzymology* 153: 516-544). В клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать ряд систем экспрессии, включая как плазмиды, так и системы, основанные на вирусах.

В другом примере полинуклеотидную последовательность, которая кодирует антиген PreF, вводят в клетки насекомых, используя систему экспрессии на основе бакуловирусных векторов (BEVS). Рекомбинантный бакуловирус, способный инфицировать клетки насекомых, может быть создан с использованием коммерчески доступных векторов, наборов и/или систем, таких как система BD VaculoGold из BD BioScience. Коротко, полинуклеотидную последовательность, кодирующую антиген, встраивают в вектор для переноса pAcSG2. Затем клетки-хозяева SF9 (*Spodoptera frugiperda*) котрансфицируют химерной плазмидой pAcSG2 и BD VaculoGold, содержащей линейаризованную геномную ДНК бакуловируса - вируса ядерного полиэдрома *Autographa californica* (AcNPV). После трансфекции происходит гомологичная рекомбинация между плазмидой pAcSG2 и бакуловирусным геномом с образованием рекомбинантного вируса. В одном примере антиген PreF экспрессируется под регуляторным контролем промотора полиэдрина (pH). Сходные векторы для переноса могут быть получены с использованием других промоторов, таких как основной промотор (Ba) и промотор p10. Подобным образом можно использовать альтернативные клетки насекомых, такие как SF21, которые близко родственны клеткам Sf9, и линия клеток High Five, полученная из капустной совки *Trichoplusia ni*.

Чаще всего полинуклеотиды, которые кодируют антигены PreF, включают в экспрессирующие век-

торы, которые подходят для введения и экспрессии в эукариотических клетках (например, клетках насекомых или млекопитающих). Предпочтительно такие нуклеиновые кислоты оптимизируют по кодонам для экспрессии в выбранном векторе/клетке-хозяине (например, последовательности, показанные в SEQ ID NO:5, 7, 9, 12, 13, 17, 19 и 21, оптимизируют в отношении кодонов для экспрессии в клетках CHO). В одном иллюстративном варианте полинуклеотидную последовательность, которая кодирует антиген PreF, вводят в вектор, такой как вектор pEE14, разработанный Lonza Biologicals. Полипептид экспрессируют под контролем конститутивного промотора, такого как немедленный ранний промотор CMV (цитомегаловируса). Селекцию стабильно трансфицированных клеток, экспрессирующих полипептид, осуществляют на основе способности трансфицированных клеток расти в отсутствие источника глутамина. Клетки, которые успешно интегрировали pEE14, способны расти в отсутствие экзогенного глутамина, так как вектор pEE14 экспрессирует фермент GS (глутаминсинтетазу). Отобранные клетки могут быть клонально размножены и охарактеризованы в отношении экспрессии требуемого полипептида PreF.

Клетку-хозяина необязательно выбирают по ее способности модулировать экспрессию встроенных последовательностей или процессировать экспрессированный белок требуемым образом. Такие модификации белка включают без ограничения гликозилирование (а также, например, ацетилирование, карбоксилирование, фосфорилирование, липидизацию и ацилирование).

Посттрансляционный процессинг, например, который расщепляет форму предшественника с образованием зрелой формы белка (например, протеазой фурином), необязательно осуществляется в контексте клетки-хозяина. Различные клетки-хозяева, такие как 3T3, COS, CHO, HeLa, BHK, MDCK, 293, WI38 и т.д., обладают специфичным клеточным аппаратом и характерными механизмами такой посттрансляционной активности и могут быть выбраны так, чтобы они обеспечивали правильную модификацию и процессинг введенного чужеродного белка.

Для долговременной продукции рекомбинантных антигенов PreF, описанных в настоящей публикации, с высоким выходом обычно используют стабильные системы экспрессии. Например, в случае линий клеток, которые стабильно экспрессируют полипептид антигена PreF, введение в клетку-хозяина осуществляют с использованием экспрессирующих векторов, которые содержат вирусные начала репликации или эндогенные элементы экспрессии и селективируемый маркерный ген. После введения вектора клеткам дают возможность расти в течение 1-2 суток в обогащенной среде перед их переводом на среду для селекции. Целью селективируемого маркера является придание резистентности к условиям селекции, и его присутствие позволяет выращивать и извлекать клетки, которые успешно экспрессируют введенные последовательности. Например, резистентные группы или колонии стабильно трансформированных клеток могут быть подвергнуты пролиферации с использованием способов культуры ткани, подходящих для типа клеток. Клетки-хозяева, трансформированные нуклеиновой кислотой, кодирующей антиген PreF, необязательно культивируют в условиях, подходящих для экспрессии и извлечения кодируемого белка из культуры клеток. Как указано выше, при необходимости клетки-хозяева можно культивировать в бессывороточной среде (и/или среде, не содержащей животных продуктов).

После трансдукции подходящей линии клеток-хозяев и выращивания клеток-хозяев до соответствующей плотности клеток выбранный промотор индуцируют подходящими способами (например, используя сдвиг температуры или химическую индукцию) и клетки культивируют в течение дополнительного периода времени. Необязательно среда содержит компоненты и/или добавки, которые уменьшают разрушение экспрессированного белка протеиназами. Например, среда, используемая для культивирования клеток с целью получения антигена PreF, может содержать ингибитор протеаз, такой как хелатирующий агент или низкомолекулярный ингибитор (например, AZ11557272, AS111793 и т.д.), чтобы уменьшить или исключить нежелательное расщепление клеточными или внеклеточными протеиназами (протеиназами матрикса).

Секретированный полипептидный продукт затем извлекают из культуральной среды. Альтернативно, клетки могут быть собраны центрифугированием, разрушены физическими или химическим способами, и полученный неочищенный экстракт сохраняют для дальнейшей очистки. Эукариотические или микробные клетки, используемые для экспрессии белков, могут быть разрушены любым удобным способом, включая циклы замораживания-размораживания, обработку ультразвуком, механическое разрушение или использованием средств, лизирующих клетки, или другие способы, которые хорошо известны специалистам в данной области.

Экспрессированные антигены PreF могут быть извлечены и очищены из культуры рекомбинантных клеток любым из ряда способов, известных в данной области, включая преципитацию сульфатом аммония или этанолом, экстракцию кислотой, фильтрацию, ультрафильтрацию, центрифугирование, анионообменную или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, хроматографию на основе гидрофобного взаимодействия, аффинную хроматографию (например, с использованием любой из систем мечения, указанных в настоящем описании), хроматографию на гидроксилпатите и хроматографию на лектине. Можно использовать необходимые стадии рефолдинга белка для получения завершенной конфигурации зрелого белка. Наконец, можно использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) на стадиях конечной очистки. В дополнение к указанным выше ссылкам в данной области хорошо известно множество способов очистки, включая, например, способы, указанные

в публикациях Sandana (1997) *Bioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc.; and Bollag et al. (1996) *Protein Methods*, 2nd Edition Wiley-Liss, NY; Walker (1996) *The Protein Protocols Handbook* Humana Press, NJ, Harris and Angal (1990) *Protein Purification Applications: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, U.K.; Scopes (1993) *Protein Purification: Principles and Practice* 3rd Edition Springer Verlag, NY; Janson and Ryden (1998) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*, Second Edition Wiley-VCH, NY и Walker (1998) *Protein Protocols on CD-ROM* Humana Press, NJ.

В одном иллюстративном варианте белки PreF извлекают из клеток согласно следующей схеме очистки. После введения рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид PreF, в клетки-хозяева СНО временно трансфицированные клетки-хозяева или размноженные стабильные популяции, содержащие введенную полинуклеотидную последовательность, выращивают в среде и в условиях, подходящих для роста, в приемлемом масштабе для требуемой цели (например, как, в общем, описано в публикации Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, third edition, Wiley-Liss, New York и в цитированных в указанной публикации ссылках). Обычно клетки выращивают в бессывороточной среде при 37°C и пересевают с интервалами в 2-3 дня во встряхиваемых флаконах или в биореакторах. Новые культуры, полученные из клеток, размноженных в таких условиях, обычно культивируют в биореакторах в бессывороточной среде и инкубируют при 27°C с pO₂, поддерживаемым на уровне 20% в течение 5-7 суток, чтобы получить антиген PreF.

Чтобы извлечь рекомбинантный антиген PreF, культуру клеток центрифугируют и надсадок культуры клеток хранят при -70°C вплоть до дальнейшего использования. После размораживания надсадков культур надсадки разбавляют в 2 раза водой MilliQ и доводят до pH 6,0, используя HCl. Разбавленный надсадок наносят со скоростью 75 см/ч на 3 л смолы CM Ceramic HyperD FF, упакованной в колонку BPG 140/500, уравновешенной 20 mM фосфатом, pH 6,0. После загрузки образца буфер для уравновешивания пропускают через колонку, чтобы снова получить исходный УФ-уровень. После промывки 5 об. колонки (CV) 25 mM фосфатного буфера, pH 7,0, осуществляют элюирование, используя 50 mM фосфатный буфер, pH 7,0, содержащий 0,1 M NaCl.

Элюат CM Hyper D разбавляют в 3,3 раза 20 mM фосфатом, pH 7,0, для нанесения на колонку объемом 270 мл с гидроксипатитом типа II (упакованной в ХК 50), уравновешенную 20 mM PO₄ (Na)-буфером, pH 7,0, 50 мл/мин. После промывки колонки буфером для уравновешивания (~3 CV) осуществляют элюирование, используя 20 mM PO₄ (Na) буфер, pH 7,0, содержащий 0,5 M NaCl.

Элюат с НА наносят со скоростью 15 мл/мин (соблюдая 10-минутный период контакта со смолой) на колонку Capto Adhere объемом 150 мл (упакованную в ХК 26), уравновешенную в 20 mM фосфате, pH 7,0. После промывки 5 CV 10 mM фосфатного буфера, pH 7,0, содержащего 0,1 M аргинина, осуществляют элюирование, используя 10 mM фосфатный буфер, pH 7,0, содержащий 0,6 M аргинина.

Элюат с Capto Adhere затем концентрируют примерно в 10 раз для нанесения на колонку для препаративной эксклюзионной хроматографии по размеру (SEC). Концентрирование осуществляют, используя полиэфирсульфоновую мембрану Pellicon 50 кД. Перед нанесением на колонку SEC вещества фильтруют через фильтр PLANOVA 20N, 100 см², при этом фильтрование используют в качестве стадии элиминации вируса. Такая стадия нанофильтрации может быть осуществлена либо после, либо перед концентрированием на мембране Pellicon.

Затем осуществляют препаративную SEC, используя колонку Superdex S200 объемом 500 мл и 10 mM фосфатный буфер (Na/K₂), содержащий 160 mM NaCl, pH 6,5 (соответствующий конечному буферу) в качестве подвижной фазы. Объем концентрированного PreF, соответствующий 5% объема колонки SEC, наносят на смолу со скоростью ~2,6 мл/мин. Обычно собирают фракции по 10 мл. Аналитические пулы фракций можно анализировать в SDS-геле, используя окрашивание серебром и при необходимости анти-НСР (белки клетки-хозяина) для Вестерн-блотов, чтобы оптимизировать выходы при минимизации уровней НСР.

Очищенную массу получали после фильтрования через фильтры Millex 0,22 мкм (альтернативно можно использовать фильтр Sterivex). При необходимости очищенный препарат антигена PreF можно хранить при -70°C до использования.

Альтернативно, белки PreF могут содержать полигистидиновую метку (например, шесть гистидинов), которую можно использовать для облегчения очистки. Для получения таких меченых гистидином полипептидов PreF можно использовать следующий протокол очистки. Перед очисткой с использованием аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металлов (ИМАС) надсадок культуры клеток разбавляют в два раза в буфере А (20 mM бицин, pH 8,5) и pH доводят до 8,5. Полученный раствор нагружают на колонку с Q-сефарозой FF (GE Healthcare), например, колонку объемом 23 мл, предварительно уравновешенную буфером А. Белки PreF улавливают на колонке вместе с некоторыми примесями из клеток-хозяев. Компоненты культуральной среды, которые могут мешать стадии ИМАС-очистки, не удерживаются и удаляются в проходящем потоке. Белки разделяют и элюируют, используя ступенчатое элюирование растворами 200, 400, 600, 800 mM и 1 M NaCl. Представляющие интерес белки PreF элюируются на первой стадии при 200 mM NaCl. Необязательно извлечение можно контролировать с помощью SDS-ПААГ и Вестерн-блоттинга, используя антитело против His-метки для выявления меченого белка PreF. Фракции могут быть объединены перед продолжением очистки.

(Объединенный) элюат, содержащий белок PreF, разбавляют в три раза в буфере В (20 мМ бисин, 500 мМ NaCl, pH 8,3) и pH доводят до 8,3. Полученный раствор наносят на смолу сефарозу FF для ИМАС, на которую нагружен хлорид никеля (GE Healthcare) (например, на колонку объемом 5 мл), предварительно уравновешенную буфером В. PreF связывается со смолой, и большая часть примесей из клеток-хозяев подвергается элюированию в проходящем потоке. Колонку промывают 20 мМ имидазолом, чтобы удалить слабо связанные примеси. Белки PreF элюируют ступенчатым элюированием с использованием 250 мМ имидазола. SDS-ПААГ с окрашиванием Кумасси синим и Вестерн-блот с антителом против His-метки могут быть осуществлены для идентификации позитивных фракций.

Пул, полученный при ИМАС, затем можно концентрировать до концентрации, составляющей по меньшей мере 150 мкг/мл, используя устройство для концентрирования Centricon (Millipore), и белок можно диализовать в PBS-буфере с добавлением 500 мМ L-аргинина. Полученный белок количественно оценивают, используя анализ белка RCDC (BioRad), и хранят при -70 или -80°C вплоть до использования.

Иммуногенные композиции и способы.

Также предлагаются иммуногенные композиции, содержащие любой из антигенов PreF, описанных выше (таких как антигены, приведенные в качестве примера в SEQ ID NO:6, 8, 10, 18, 20 и 22), и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

В некоторых вариантах, обычно в тех вариантах, в которых антиген PreF не содержит G-белкового компонента (такого как последовательность SEQ ID NO:6), иммуногенная композиция может содержать изолированный, рекомбинантный и/или очищенный G-белок. Многочисленные подходящие G-белки были описаны в данной области и включают полноразмерные рекомбинантные G-белки и химерные белки, состоящие из части G-белка (например, аминокислот 128-229 или 130-230) и партнера в слиянии (такого как тиоредоксин) или сигнальной и/или лидерной последовательности, которая облегчает экспрессию и/или очистку. Примеры G-белков для применения в смеси с антигеном PreF можно найти в WO 2008114149, патенте США № 5149650, патенте США № 6113911, опубликованной заявке на выдачу патента США № 20080300382 и патенте США № 7368537, каждая из указанных публикаций включена в настоящее описание в виде ссылки. Как указано в связи с химерными белками PreF-G, меньший по размеру фрагмент G-белка, такой как часть, состоящая из аминокислот 149-229 или часть примерно от аминокислоты 128 до примерно аминокислоты 229, предпочтительно можно использовать в контексте смесей, содержащих PreF (без G) и G. Как обсуждается выше, важным фактором является присутствие иммунодоминантных эпитопов, например, входящих в область аминокислот 183-197. Альтернативно, в таких композициях можно использовать полноразмерный G-белок.

Фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты хорошо известны и могут быть выбраны специалистами в данной области. Например, носитель или эксципиент предпочтительно может содержать буфер. Необязательно носитель или эксципиент также содержит по меньшей мере один компонент, который стабилизирует растворимость и/или стабильность. Примеры солибилизирующих/стабилизирующих средств включают детергенты, например лаурилсаркозил и/или твин. Альтернативные солибилизирующие/стабилизирующие средства включают аргинин и стеклообразующие полиолы (такие как сахароза, трегалоза и тому подобные). Многочисленные фармацевтически приемлемые носители и/или фармацевтически приемлемые эксципиенты известны в данной области и описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 5th Edition (975).

Соответственно специалистами в данной области могут быть выбраны подходящие эксципиенты и носители для получения препарата, подходящего для доставки пациенту выбранным путем введения.

Подходящие эксципиенты включают без ограничения глицерин, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сорбит, трегалозу, натриевую соль N-лауроилсаркозина, L-пролин, недетергентный сульфобетаин, гидрохлорид гуанидина, мочевины, оксид триметиламина, KCl, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ и другие родственные соли двухвалентных катионов, дитиотреитол, дитиозеитрол и β-меркаптоэтанол. Другие эксципиенты могут представлять собой детергенты (включая твин 80, твин 20, тритон X-00, NP-40, эмпиген ВВ, октилглюкозид, лауроилмальтозид, цвиттергент 3-08, цвиттергент 3-0, цвиттергент 3-2, цвиттергент 3-4, цвиттергент 3-6, CHAPS, дезоксихолат натрия, додецилсульфат натрия, бромид цетилтриметиламмония).

Необязательно иммуногенные композиции также содержат адъювант. В контексте иммуногенной композиции, подходящей для введения пациенту с целью вызывания защитного иммунного ответа против РСВ, адъювант выбирают так, чтобы он вызывал смещенный в сторону Th1 или сбалансированный по Th1/Th2 иммунный ответ, характеризуемый продукцией интерферона-гамма (IFN-γ).

Адъювант обычно выбирают так, чтобы он усиливал смещенный в сторону Th1 иммунный ответ (или сбалансированный по Th1/Th2 иммунный ответ), характеризуемый продукцией и секрецией IFN-γ, у пациента или в популяции пациентов, которым вводят композицию. Например, когда иммуногенную композицию необходимо ввести пациенту конкретной возрастной группы, чувствительной (или подвергающейся повышенному риску) РСВ-инфекции, адъювант выбирают так, чтобы он был безопасным и эффективным для пациента или популяции пациентов. Таким образом, в случае приготовления иммуно-

генной композиции, содержащей антиген PreF PCV для введения пожилому человеку (такому как человек старше 65 лет), адъювант выбирают так, чтобы он был безопасным и эффективным для пожилого человека. Подобным образом, в том случае, когда иммуногенная композиция, содержащая антиген PreF PCV, предназначена для введения новорожденным или маленьким детям (таким как дети от рождения до двухлетнего возраста), адъювант выбирают так, чтобы он был безопасным и эффективным у новорожденных и маленьких детей. В случае адъюванта, выбранного в отношении безопасности и эффективности у новорожденных и маленьких детей, может быть выбрана доза адъюванта, которая является разведением (например, дробной дозой) дозы, обычно вводимой взрослому человеку.

Кроме того, адъювант обычно выбирают так, чтобы он усиливал иммунный Th1-ответ при введении тем путем введения, которым вводят иммуногенную композицию. Например, в случае приготовления иммуногенной композиции, содержащей антиген PreF, для назального введения предпочтительными смещающими ответ в сторону Th1 адъювантами являются адъюванты на основе протеосом и протоллин. Напротив, когда иммуногенную композицию готовят для внутримышечного введения, предпочтительно выбирают адъюванты, включающие один или несколько из следующих средств: 3D-MPL, сквален (например, QS21), липосомы и/или масляные и водные эмульсии.

Одним подходящим адъювантом для использования в сочетании с антигенами PreF является нетоксичное производное бактериального липополисахарида. Примером подходящего нетоксичного производного липида А является монофосфориллипид А или более конкретно 3-деацелированный монофосфориллипид А (3D-MPL). 3D-MPL продается под названием MPL GlaxoSmithKline Biologicals N.A., и он упоминается на протяжении документа как MPL или 3D-MPL; см., например, патенты США № 4436727, 4877611, 4866034 и 4912094. 3D-MPL, прежде всего, стимулирует ответы Т-клеток CD4+ с фенотипом IFN- γ (Th1). 3D-MPL может быть получен способами, описанными в GB2220211 А. Химически он представляет собой смесь 3-деацелированного монофосфориллипид А с 3, 4, 5 или 6-ацелированными цепями. В композициях согласно настоящему изобретению можно использовать мелкие частицы 3D-MPL. 3D-MPL в виде мелких частиц имеет такой размер частиц, что его можно стерильно фильтровать через фильтр 0,22 мкм. Такие препараты описаны в WO 94/21292.

Липополисахарид, такой как 3D-MPL, можно использовать в количествах от 1 до 50 мкг в дозе иммуногенной композиции для человека. Такой 3D-MPL можно использовать на уровне примерно 25 мкг, например 20-30 мкг, в соответствующих случаях 21-29 мкг, или от 22 до 28 мкг, или от 23 до 27 мкг, или от 24 до 26 мкг, или 25 мкг. В другом варианте доза иммуногенной композиции для человека содержит 3D-MPL на уровне примерно 10 мкг, например от 5 до 15 мкг, в соответствующих случаях от 6 до 14 мкг, например от 7 до 13 мкг, или от 8 до 12 мкг, или от 9 до 11 мкг, или 10 мкг. В следующем варианте доза иммуногенной композиции для человека содержит 3D-MPL на уровне примерно 5 мкг, например от 1 до 9 мкг или от 2 до 8 мкг, или в соответствующих случаях от 3 до 7 мкг, или 4, или 5 мкг.

В других вариантах липополисахаридом может быть β (1-6)глюкозаминдисахарид, который описан в патенте США № 6005099 и патенте EP № 0729473 B1. Специалист в данной области легко может получить различные липополисахариды, такие как 3D-MPL, на основе инструкций, приведенных в указанных публикациях. Тем не менее, каждая из указанных публикаций включена в настоящее описание в виде ссылки. В дополнение к указанным выше иммуностимуляторам (которые сходны по структуре с ЛПС, или MPL, или 3D-MPL), также подходящими адъювантами являются ацелированные моносахаридные и дисахаридные производные, которые могут представлять собой некоторую часть указанной выше структуры MPL. В других вариантах адъювантом являются синтетические производные липида А, некоторые из которых описаны как агонисты TLR-4 и которые включают без ограничения OM174 (2-дезоксидеокси-6-о-[2-дезоксидеокси-2-[(R)-3-додеканоилокситетрадеканоиламино]-4-о-фосфоно- β -D-гликопиранозил]-2-[(R)-3-гидрокситетрадеканоиламино]- α -D-гликопиранозилдигидрогенфосфат), (WO 95/14026); OM 294 DP (3S,9R)-3-[(R)-додеканоилокситетрадеканоиламино]-4-оксо-5-аза-9(R)-[(R)-3-гидрокситетрадеканоиламино]декан-1,10-диол,1,10-бис-(дигидрогенфосфат) (WO 99/64301 и WO 00/0462) и OM 197 MP-Ac DP (3S-,9R)-3-[(R)-додеканоилокситетрадеканоиламино]-4-оксо-5-аза-9-[(R)-3-гидрокситетрадеканоиламино]декан-1,10-диол,1-дигидрогенфосфат-10-(6-аминогексаноат) (WO 01/46127).

Другими лигандами TLR4, которые можно использовать, являются алкилглюкозаминидфосфаты (AGP), такие как соединения, описанные в WO 98/50399 или патенте США № 6303347 (также описаны способы получения AGP), соответственно RC527 или RC529 или фармацевтически приемлемые соли AGP, которые описаны в патенте США № 6764840. Некоторые AGP являются агонистами TLR4, а некоторые являются антагонистами TLR4. Полагают, что и те и другие применимы в качестве адъювантов.

Другим подходящим лигандом TLR-4, способным вызывать ответ в виде передачи сигнала через TLR-4 (Sabroe et al., JI 2003 p. 1630-5), является, например, липополисахарид из грамотрицательных бактерий и его производные или его фрагменты, в частности нетоксичное производное ЛПС (такое как 3D-MPL). Другими подходящими агонистами TLR являются белок теплового шока (HSP) 10, 60, 65, 70, 75 или 90; поверхностно-активный белок А, олигосахариды гиалуронана, фрагменты гепарансульфата, фрагменты фибронектина, пептиды фибриногена, b-дефензин-2 и мурамилдипептид (MDP). В одном варианте агонистом TLR является HSP 60, 70 или 90. Другие подходящие лиганды TLR-4 описаны в WO

2003/011223 и в WO 2003/099195, такие как соединение I, соединение II и соединение III, описанные на с. 4 и 5 в WO 2003/011223 или на с. 3 и 4 в WO 2003/099195 и, в частности, соединения, описанные в WO 2003/011223 как ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057, ER804058, ER804059, ER804442, ER804680 и ER804764. Например, одним подходящим лигандом TLR-4 является ER804057.

Дополнительные агонисты TLR также применимы в качестве адъювантов. Термин "агонист TLR" относится к средству, которое способно вызывать ответ в виде передачи сигнала через пути передачи сигналов TLR, либо в качестве непосредственного лиганда, либо опосредованно через образование эндогенного или экзогенного лиганда. Такие природные или синтетические агонисты TLR могут быть использованы в качестве альтернативных или дополнительных адъювантов. Краткий обзор роли TLR в качестве рецепторов адъювантов приведен в публикации Kaisho and Akira, *Biochimica et Biophysica Acta* 1589: 1-13, 2002. Такие потенциальные адъюванты включают без ограничения агонисты TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9. Соответственно в одном варианте адъювант и иммуногенная композиция дополнительно содержит адъювант, который выбран из группы, состоящей из агониста TLR-1, агониста TLR-2, агониста TLR-3, агониста TLR-4, агониста TLR-5, агониста TLR-6, агониста TLR-7, агониста TLR-8, агониста TLR-9 или их сочетания.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения используют агонист TLR, который способен вызвать ответ в виде передачи сигнала через TLR-1. Соответственно агонист TLR, способный вызывать ответ в виде передачи сигнала через TLR-1, выбран из триацилированных липопептидов (LP); растворимого в феноле модулина; LP *Mycobacterium tuberculosis*; S-(2,3-бис-(пальмитоилокси)-(2-RS)-пропил)-N-пальмитоил-(R)-цис-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH, тригидрохлорида (Pam3Cys)-LP, который имитирует ацетилованный аминоконец бактериального липопротеида и LP OspA из *Borrelia burgdorferi*.

В альтернативном варианте используют агонист TLR, который способен вызывать ответ в виде передачи сигнала через TLR-2. Соответственно агонистом TLR, способным вызывать ответ в виде передачи сигнала через TLR-2, является одно или несколько из следующих средств: липопротеид, пептидогликан, бактериальный липопептид из *M. tuberculosis*, *B. burgdorferi* или *T. pallidum*; пептидогликаны некоторых видов, включая *Staphylococcus aureus*; липотейхоевые кислоты, маннуроновые кислоты, порины *Neisseria*, бактериальные фимбрии, факторы вирулентности *Yersina*, вирионы CMV, гемагглютинин вируса кори и зимозан дрожжей.

В альтернативном варианте используют агонист TLR, который способен вызывать ответ в виде передачи сигнала через TLR-3. Соответственно агонистом TLR, способным вызывать ответ в виде передачи сигнала через TLR-3, является двунитевая РНК (днРНК) или полиинозиновая-полицитидиловая кислота (поли-IC), молекулярная картина нуклеиновых кислот, ассоциированная с вирусной инфекцией.

В альтернативном варианте используют агонист TLR, который способен вызывать ответ в виде передачи сигнала через TLR-5. Соответственно агонистом TLR, способным вызывать ответ в виде передачи сигнала через TLR-5, является бактериальный флагеллин.

В альтернативном варианте используют агонист TLR, который способен вызывать ответ в виде передачи сигнала через TLR-6. Соответственно агонистом TLR, способным вызывать ответ в виде передачи сигнала через TLR-6, является липопротеид микобактерий, диацелированный LP и растворимый в феноле модулин. Дополнительные агонисты TLR6 описаны в WO 2003/043572.

В альтернативном варианте используют агонист TLR, который способен вызывать ответ в виде передачи сигнала через TLR-7. Соответственно агонистом TLR, способным вызывать ответ в виде передачи сигнала через TLR-7, является одонитевая РНК (онРНК), локсоридин, аналог гуанозина в положениях N7 и C8 или соединение имидазохинолина или его производное. В одном варианте агонистом TLR является имиквимод. Дополнительные агонисты TLR7 описаны в WO 2002/085905.

В альтернативном варианте используют агонист TLR, который способен вызывать ответ в виде передачи сигнала через TLR-8. Соответственно агонистом TLR, способным вызывать ответ в виде передачи сигнала через TLR-8, является одонитевая РНК (онРНК), молекула имидазохинолина с противовирусной активностью, например резиквимод (R848); резиквимод также может распознаваться TLR-7. Другие агонисты TLR-8, которые можно использовать, включают агонисты, описанные в WO 2004/071459.

В альтернативном варианте используют агонист TLR, который способен вызывать ответ в виде передачи сигнала через TLR-9. В одном варианте агонистом TLR, способным вызывать ответ в виде передачи сигнала через TLR-9, является HSP90. Альтернативно, агонистом TLR, способным вызывать ответ в виде передачи сигнала через TLR-9, является бактериальная или вирусная ДНК, ДНК, содержащая неметилованные нуклеотиды CpG, в частности контексты последовательности, известные как мотивы CpG. CpG-содержащие олигонуклеотиды преимущественно индуцируют Th1-ответ. Такие олигонуклеотиды хорошо известны и описаны, например, в WO 96/02555, WO 99/33488 и патентах США № 6008200 и 5856462. Соответственно CpG-нуклеотиды являются CpG-олигонуклеотидами. Подходящими олигонуклеотидами для применения в иммуногенных композициях согласно настоящему изобретению являются CpG-содержащие олигонуклеотиды, необязательно содержащие два или более мотивов динуклеотидов CpG, разделенных по меньшей мере тремя, в соответствующих случаях по меньшей мере шестью или большим количеством нуклеотидов. Мотив CpG представляет собой цитозиновый нуклеотид, за которым следует гуаниновый нуклеотид. CpG-олигонуклеотиды согласно настоящему изобретению обычно пред-

ставляют собой дезоксирибонуклеотиды. В конкретном варианте между нуклеотидами в олигонуклеотиде присутствует фосфородитионат, или соответственно фосфоротионатная связь, хотя фосфодиэфирные и другие межнуклеотидные связи входят в объем изобретения. Также в объем изобретения входят олигонуклеотиды со смешанными межнуклеотидными связями. Способы получения фосфоротионатных олигонуклеотидов или фосфородитионатов описаны в патентах США № 5666153, 5278302 и в WO 95/26204.

Другие адъюванты, которые можно использовать в иммуногенных композициях с антигенами PreF, например, отдельно или в сочетании с 3D-MPL или другим адъювантом, описанным в настоящей публикации, являются сапонины, такие как QS21.

Сапонины обсуждаются в публикации Lacaille-Dubois M. and Wagner H. (1996, A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*, vol. 2, p. 363-386). Сапонины являются стероидными или тритерпеновыми гликозидами, широко распространенными в царствах растений и морских животных. Сапонины предлагали для образования коллоидных растворов в воде, которые пенятся при встряхивании, и для преципитации холестерина. Когда сапонины находятся вблизи клеточных мембран, они создают подобные порам структуры в мембране, что приводит к разрыву мембраны. Гемолиз эритроцитов является примером такого явления, которое обусловлено свойством некоторых, но не всех, сапонинов.

Сапонины известны в качестве адъювантов в вакцинах для системного введения. Адъювантная и гемолитическая активность отдельных сапонинов широко исследована в данной области (Lacaille-Dubois и Wagner, выше). Например, Quil A (получаемый из коры южноамериканского дерева *Quillaja Saponaria Molina*) и его фракции описаны в US 5057540 и в публикации "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C.R., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 1996, 12 (1-2): 1-55 и в EP 0362279 B1. Структуры частиц, называемых иммуностимулирующими комплексами (ISCOMS), содержащие фракции Quil A, являются гемолитическими и были использованы в производстве вакцин (Morein, B., EP 0109942 B1; WO 96/11711; WO 96/33739). Гемолитические сапонины QS21 и QS17 (очищенные с использованием ВЭЖХ фракции Quil A) описаны как сильные системные адъюванты, и способ их получения описан в патенте США № 5057540 и в EP 0362279 B1, которые включены в настоящее описание в виде ссылки. Другие сапонины, которые применяли в исследованиях системной вакцинации, включают сапонины, полученные из других видов растений, таких как *Gypsophila* и *Saponaria* (Bomford et al., *Vaccine*, 10(9): 572-577, 1992).

QS21 представляет собой очищенную с использованием ВЭЖХ нетоксичную фракцию, полученную из коры *Quillaja Saponaria Molina*. Способ получения QS21 описан в патенте США № 5057540. Нерактогенные адъювантные препараты, содержащие QS21, описаны в WO 96/33739. Вышеуказанные публикации включены в настоящее описание в виде ссылки. Указанный иммунологически активный сапонин, такой как QS21, можно использовать в количествах от 1 до 50 мкг на дозу для человека в иммуногенной композиции.

Преимущественно QS21 используют на уровне примерно 25 мкг, например 20-30 мкг, в соответствующих случаях 21-29 мкг, или 22-28 мкг, или 23-27 мкг, или 24-26 мкг, или 25 мкг. В другом варианте доза иммуногенной композиции для человека содержит QS21 на уровне примерно 10 мкг, например от 5 до 15 мкг, в соответствующих случаях 6-14 мкг, например 7-13 мкг, или 8-12 мкг, или 9-11 мкг, или 10 мкг. В следующем варианте доза иммуногенной композиции для человека содержит QS21 на уровне примерно 5 мкг, например 1-9 мкг, или 2-8 мкг, или в соответствующем случае 3-7 мкг, или 4-6 мкг, или 5 мкг. Показано, что такие препараты, содержащие QS21 и холестерин, являются успешными Th1-стимулирующими адъювантами в случае приготовления вместе с антигеном. Таким образом, например, полипептиды PreF предпочтительно можно использовать в иммуногенных композициях с адъювантом, содержащим сочетание QS21 и холестерина.

Необязательно адъювант также может содержать неорганические соли, такие как соли алюминия или кальция, в частности гидроксид алюминия, фосфат алюминия и фосфат кальция. Например, адъювант, содержащий 3D-MPL в сочетании с солью алюминия (например, гидроксидом алюминия или "квасцами"), является подходящим для приготовления иммуногенной композиции, содержащей антиген PreF, для введения человеку.

Другой класс подходящих смещающих в сторону Th1 адъювантов для применения в препаратах антигенов PreF включает основанные на ОМР иммуностимулирующие композиции. Основанные на ОМР иммуностимулирующие композиции особенно применимы в качестве мукозных адъювантов, например, для интраназального введения. Основанные на ОМР иммуностимулирующие композиции составляют род препаратов белков наружной мембраны (ОМР, включая некоторые порины) грамотрицательных бактерий, таких как, например, но без ограничения, виды *Neisseria* (см., например, Lowell et al., *J. Exp. Med.* 167:658, 1988; Lowell et al., *Science* 240:800, 1988; Lynch et al., *Biophys. J.* 45:104, 1984; Lowell, in "New Generation Vaccines" 2nd ed., Marcel Dekker, Inc., New York, Basil, Hong Kong, p. 193, 1997; U.S. Pat. No. 5726292; U.S. Pat. No. 4707543), патент США № 5726292, патент США № 4707543), которые применимы в качестве носителя или в композициях для иммуногену, таких как бактериальные или вирусные антигены. Некоторые основанные на ОМР иммуностимулирующие композиции могут быть названы "протеосомами", которые являются гидрофобными и безопасными для применения на человеке. Протеосомы обладают способностью к самосборке в везикулы или везикулоподобные кластеры ОМР размером при-

мерно от 20 до примерно 800 нм, и к нековалентному включению, координированию, ассоциации (например, электростатически или гидрофобно) или иной кооперации с белковыми антигенами (Аг), особенно антигенами, которые имеют гидрофобный компонент. Любой способ получения, который в результате дает компонент белка наружной мембраны в форме везикул или в везикулоподобной форме, включая состоящие из многомoleкулярных мембран структуры или композиции ОМР в подобной расплавленной глобуле форме, содержащие один или несколько ОМР, включен в определение протеосомы. Протеосомы могут быть получены, например, как описано в данной области (см., например, патент США № 5726292 или патент США № 5985284). Протеосомы также могут содержать эндогенный липополисахарид или липоолигосахарид (ЛПС или ЛОС соответственно), происходящие из бактерий, используемых для получения поринов ОМР (например, вида *Neisseria*), которые обычно составляют менее чем 2% от общего препарата ОМР.

Протеосомы, главным образом, состоят из химически экстрагированных белков наружной мембраны (ОМР) из *Neisseria meningitidis* (чаще всего поринов А и В, а также ОМР класса 4), поддерживаемых в растворе с помощью детергента (Lowell G.H. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. In: Levine M.M., Woodrow G.C., Kaper J.B., Cobon G.S., eds, New Generation Vaccines. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206). Протеосомы могут быть приготовлены с разными антигенами, такими как очищенные или рекомбинантные белки, полученные из вирусных источников, включая полипептиды PreF, описанные в настоящей публикации, например, с использованием диафильтрации или традиционных способов диализа. Постепенное удаление детергента обеспечивает возможность для образования гидрофобных комплексов в виде частиц диаметром примерно 100-200 нм (Lowell G.H. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. In: Levine M.M., Woodrow G.C., Kaper J.B., Cobon G.S., eds, New Generation Vaccines. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206).

"Протеосома: ЛПС или протоллин" в используемом в настоящем описании смысле относится к препаратам протеосом, смешанных, например, в результате экзогенного добавления по меньшей мере с одним видом липополисахарида, для получения композиции ОМР-ЛПС (которая может функционировать в качестве иммуностимулирующей композиции). Таким образом, композиция ОМР-ЛПС может состоять из двух основных компонентов протоллина, которые включают (1) препарат протеосом на основе белков наружной мембраны (например, Projuvant), полученный из грамотрицательных бактерий, таких как *Neisseria meningitidis*, и (2) препарат одного или нескольких липосахаридов. Липоолигосахарид может быть эндогенным (например, природно входящим в препарат протеосом на основе ОМР), его можно смешивать или сочетать с препаратом ОМР в случае получения экзогенного липоолигосахарид (например, получения из другой культуры или микроорганизма, чем культура или микроорганизм, из которого получен препарат ОМР), или возможно сочетание указанных вариантов. Такой экзогенно добавляемый ЛПС может быть из той же грамотрицательной бактерии, из которой получают препарат ОМР, или из другой грамотрицательной бактерии. Также следует понимать, что протоллин необязательно содержит липиды, гликолипиды, гликопротеиды, малые молекулы или тому подобное и их сочетания. Протоллин может быть получен, например, как описано в публикации заявки на выдачу патента США № 2003/0044425.

Сочетания разных адъювантов, таких как адъюванты, упоминаемые выше, также можно использовать в композициях с антигенами PreF. Например, как уже отмечалось, QS21 может быть приготовлен вместе с 3D-MPL. Соотношение QS21:3D-MPL обычно может быть порядка от 1:10 до 10:1; например от 1:5 до 5:1, и часто, по существу, 1:1. Обычно соотношение находится в диапазоне от 2,5:1 до 1:1 3D-MPL:QS21. Препарат с другим сочетанием адъювантов включает 3D-MPL и соль алюминия, например гидроксид алюминия. В случае приготовления в сочетании такое сочетание может усиливать антиген-специфичный иммунный ответ Th1.

В некоторых случаях адъювантный препарат содержит минеральную соль, такую как соль кальция или алюминия (квасцы), например фосфат кальция, фосфат алюминия или гидроксид алюминия. В случае присутствия квасцов, например, в сочетании с 3D-MPL количество обычно составляет примерно от 100 мкг до 1 мг, например около 100 мкг, или примерно от 200 мкг до примерно 750 мкг, например около 500 мкг на дозу.

В некоторых вариантах адъювант содержит масляную и водную эмульсию, например эмульсию типа масло-в-воде. Один пример эмульсии типа масло-в-воде содержит метаболизируемое масло, такое как сквален, токол, такой как токоферол, например альфа-токоферол, и поверхностно-активное вещество, такое как триолеат сорбитана (Span 85TM) или моноолеат полиоксиэтиленсорбитана (твин 80TM), в водном носителе. В некоторых вариантах эмульсия типа масло-в-воде не содержит никаких дополнительных иммуностимуляторов (в частности, не содержит нетоксичного производного липида А, такого как 3D-MPL, или сапонины, такого как QS21). Водным носителем может быть, например, фосфатно-солевой буфер. Кроме того, эмульсия типа масло-в-воде может содержать span 85, и/или лецитин, и/или трикаприлин.

В другом варианте изобретения предлагается композиция вакцины, содержащая антиген или антигенную композицию и адъювантную композицию, содержащую эмульсию типа масло-в-воде и необязательно один или несколько дополнительных иммуностимуляторов, при этом указанная эмульсия типа

масло-в-воде содержит 0,5-10 мг метаболизируемого масла (в соответствующих случаях сквалена), 0,5-11 мг токола (в соответствующих случаях токоферола, такого как альфа-токоферол) и 0,4-4 мг эмульгатора.

В одном конкретном варианте адъювантный препарат содержит 3D-MPL, полученный в форме эмульсии, такой как эмульсия типа масло-в-воде. В некоторых случаях эмульсия имеет небольшой размер части, менее 0,2 мкм в диаметре, как описано в WO 94/21292. Например, частицы 3D-MPL могут быть достаточно мелкими, чтобы их можно было стерильно фильтровать через мембрану 0,22 мкм (как описано в Европейском патенте № 0689454). Альтернативно, 3D-MPL может быть получен в форме липосомного препарата. Необязательно адъювант, содержащий 3D-MPL (или его производное), также содержит дополнительный иммуностимулирующий компонент.

Адъювант выбирают так, чтобы он был безопасен и эффективен в популяции, в которой вводят иммуногенную композицию. В случае популяций взрослых и пожилых людей препараты обычно содержат больше адъювантного компонента, чем обычно содержится в препарате для маленьких детей. В конкретных препаратах с использованием эмульсии типа масло-в-воде такая эмульсия может содержать дополнительные компоненты, например, такие как холестерин, сквален, альфа-токоферол и/или детергент, такой как твин-80 или span 85. В иллюстративных препаратах такие компоненты могут присутствовать в следующих количествах: примерно 1-50 мг холестерина, 2-10% сквалена, от 2 до 10% альфа-токоферола и от 0,3 до 3% твина-80. Обычно соотношение сквален:альфа-токоферол меньше или равно 1, так как такое соотношение обеспечивает более стабильную эмульсию. В некоторых случаях препарат также может содержать стабилизатор.

В том случае, когда иммуногенную композицию с полипептидным антигеном PreF готовят для введения маленьким детям, определяют дозу адъюванта, чтобы она была эффективной и относительно неактогенной у ребенка. В общем, доза адъюванта в препарате для детей младшего возраста ниже (например, доза может составлять часть дозы, имеющейся в препарате для введения взрослым), чем доза, используемая в препаратах, предназначенных для введения взрослому человеку (например, взрослым в возрасте 65 лет и старше). Например, количество 3D-MPL обычно находится в диапазоне 1-200 мкг, например 10-100 мкг или 10-50 мкг на дозу. Доза для детей младшего возраста обычно соответствует нижнему пределу указанного диапазона, например примерно от 1 до примерно 50 мкг, например примерно от 2 или примерно от 5, или примерно от 10, примерно до 25 или примерно до 50 мкг. Обычно в случае использования в препарате QS21 диапазоны сравнимы (и соответствуют соотношениям, указанным выше). В случае масляной и водной эмульсии (например, эмульсии типа масло-в-воде) доза адъюванта, предлагаемая детям или младенцам, может составлять часть от дозы, вводимой взрослому человеку. Демонстрация эффективности иммуногенных композиций, содержащих антиген PreF в сочетании с различными дозами иллюстративного адъюванта типа масло-в-воде, приведена в примере 9.

Иммуногенная композиция обычно содержит иммунопротекторное количество (или его дробную дозу) антигена и может быть получена обычными способами. Получение иммуногенных композиций, включая композиции для введения человеку, в общем описано в *Pharmaceutical Biotechnology*, Vol. 61 *Vaccine Design—the subunit and adjuvant approach*, edited by Powell and Newman, Plenum Press, 1995. *New Trends and Developments in Vaccines*, edited by Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978. Инкапсулирование в липосомы описано, например, Fullerton в патенте США 4235877. Конъюгирование белков с макромолекулами описано, например, Likhite в патенте США 4372945 и Armor с соавт. в патенте США 4474757.

Обычно количество белка в каждой дозе иммуногенной композиции выбирают в виде количества, которое индуцирует иммунопротекторный ответ без существенных неблагоприятных побочных эффектов у обычного человека. Иммунопротекторный в данном контексте необязательно означает полную защиту от инфекции; термин означает защиту от симптомов или заболевания, особенно тяжелого заболевания, ассоциированного с вирусом. Количество антигена может варьировать в зависимости от того, какой конкретный иммуноген используют. Обычно предполагается, что каждая доза для человека будет содержать 1-1000 мкг белка, например примерно от 1 до примерно 100 мкг, например примерно от 1 до примерно 50 мкг, например примерно 1, примерно 2, примерно 5, примерно 10, примерно 15, примерно 20, примерно 25, примерно 30, примерно 40 или примерно 50 мкг. Количество, используемое в иммуногенной композиции, выбирают в зависимости от популяции человека (например, детей младшего возраста или пожилых людей). Оптимальное количество для конкретной композиции можно установить стандартными исследованиями, заключающимися в определении титров антител и других ответов у человека. После начальной вакцинации пациенты могут быть подвергнуты бустер-иммунизации примерно через 4 недели.

Следует отметить, что независимо от выбранного адъюванта концентрацию конечного препарата вычисляют так, чтобы она была безопасной и эффективной в целевой популяции. Например, иммуногенные композиции, предназначенные для того, чтобы вызвать иммунный ответ против РСВ у человека, предпочтительно вводят детям младшего возраста (например, детям от рождения до 1 года, например в возрасте от 0 до 6 месяцев, возрасте введения начальной дозы). Иммуногенные композиции, предназначенные для того, чтобы вызвать иммунный ответ против РСВ, также предпочтительно вводят пожилым

людям (например, отдельно или в сочетании с антигенами других патогенов, ассоциированных с COPD). Будет понятно, что выбор адъюванта может отличаться при разных применениях, и оптимальный адъювант и концентрация для каждой ситуации могут быть определены эмпирически специалистами в данной области.

В некоторых вариантах иммуногенные композиции представляют собой вакцины, которые уменьшают или предотвращают инфекцию РСВ. В некоторых вариантах иммуногенные композиции представляют собой вакцины, которые уменьшают или предотвращают патологический ответ после инфекции РСВ. Необязательно иммуногенные композиции, содержащие антиген PreF, готовят по меньшей мере с одним дополнительным антигеном другого патогенного организма, отличного от РСВ. Например, патогенным организмом может быть патоген дыхательных путей (такой как вирус или бактерия, которая вызывает инфекцию дыхательных путей). В некоторых случаях иммуногенная композиция содержит антиген, полученный из другого патогенного вируса, отличного от РСВ, такого как вирус, который вызывает инфекцию дыхательных путей, такого как вирус гриппа или парагриппа. В других вариантах дополнительные антигены выбраны для облегчения введения или уменьшения количества прививок, необходимых для защиты от множества инфекционных организмов. Например, антиген может быть получен из любого одного или нескольких организмов, вызывающих, наряду с прочим, грипп, гепатит В, дифтерию, столбняк, коклюш, а также *Nemophilus influenza*, вируса полиомиелита, *Streptococcus* или *Pneumococcus*.

Соответственно применение антигенов PreF или нуклеиновых кислот, которые их кодируют, в препарате лекарственного средства для лечения (либо терапевтического после, либо профилактического до) воздействия или инфекции РСВ также является отличительным признаком настоящего изобретения. Подобным образом, способы вызывания иммунного ответа против РСВ у пациента являются отличительным признаком настоящего изобретения. Такие способы включают введение иммунологически эффективного количества композиции, содержащей антиген PreF, пациенту, такому как человек. Обычно композиция содержит адъювант, который вызывает смещенный в сторону Th1 иммунный ответ. Композицию готовят так, чтобы она вызывала иммунный ответ, специфичный для РСВ, без усиления вирусного заболевания после контакта с РСВ. То есть композицию готовят для получения смещенного в сторону Th1 иммунного ответа, который уменьшает или предотвращает инфекцию РСВ и/или уменьшает или предотвращает патологический ответ после инфекции РСВ. Хотя композиция может быть введена множеством разных путей, чаще всего иммуногенные композиции доставляют внутримышечным или интраназальным путем введения.

Иммуногенная композиция обычно содержит иммунопротекторное количество (или его дробную дозу) антигена и может быть получена обычными способами. Получение иммуногенных композиций, включая композиции для введения человеку, в общем описано в *Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 61 Vaccine Design—the subunit and adjuvant approach*, edited by Powell and Newman, Plenum Press, 1995. *New Trends and Developments in Vaccines*, edited by Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978. Инкапсулирование в липосомы описано, например, Fullerton в патенте США 4235877. Конъюгирование белков с макромолекулами описано, например, Likhite в патенте США 4372945 и Armor с соавт. в патенте США 4474757.

Обычно количество белка в каждой дозе иммуногенной композиции выбирают в виде количества, которое индуцирует иммунопротекторный ответ без существенных неблагоприятных побочных эффектов у обычного человека. Иммунопротекторный в данном контексте необязательно означает полную защиту от инфекции; термин означает защиту от симптомов или заболевания, особенно тяжелого заболевания, ассоциированного с вирусом. Количество антигена может варьировать в зависимости от того, какой конкретный иммуноген используют. Обычно предполагается, что каждая доза для человека будет содержать 1-1000 мкг белка, например примерно от 1 до примерно 100 мкг, например примерно от 1 до примерно 50 мкг, например примерно 1, примерно 2, примерно 5, примерно 10, примерно 15, примерно 20, примерно 25, примерно 30, примерно 40 или примерно 50 мкг. Количество, используемое в иммуногенной композиции, выбирают в зависимости от популяции человека (например, детей младшего возраста или пожилых людей). Оптимальное количество для конкретной композиции можно установить стандартными исследованиями, заключающимися в определении титров антител и других ответов у человека. После начальной вакцинации пациенты могут быть повергнуты бустер-иммунизации примерно через 4-12 недель. Например, при введении иммуногенной композиции, содержащей антиген PreF, ребенку начальную и последующие прививки можно вводить, совмещая их с другими вакцинами, вводимыми в этот период.

Следующие примеры предлагаются для иллюстрации некоторых конкретных признаков и/или вариантов. Такие примеры не следует интерпретировать как ограничение изобретения конкретными описанными признаками или вариантами.

Примеры

Пример 1. Иллюстративные антигены PreF.

Антиген PreF модифицировали по сравнению с нативным белком F₀ РСВ, чтобы стабилизировать белок в его конформации, имеющейся до слияния, на основе прогнозирования того, что иммунный ответ, генерируемый по отношению к конформации F до слияния предпочтительно может включать антитела, которые могут предотвращать связывание, изменение конформации и/или другие события, вовлеченные в слияние с мембраной, тем самым повышая эффективность защитной реакции.

Фиг. 1А и В схематично иллюстрируют характерные особенности F₀ РСВ и примеров рекомбинантных антигенов PreF. На фиг. 1А представлен белок F₀ РСВ. F₀ является пребелком, состоящим из 574 аминокислот. Пребелок F₀ протеолитически процессируется и гликозилируется после трансляции. Сигнальный пептид, который удаляется позже сигнальной пептидазой, направляет транслированный пребелок F₀ в эндоплазматическую сеть (ЭС). Затем образовавшийся пептид в ЭС N-гликозилируется в нескольких участках (указанных треугольниками). Расщепление фурином F₀ приводит к образованию пептидных доменов F2 и F1, которые подвергаются фолдингу и собираются вместе в виде тримера гетеродимеров F2-F1 (то есть трижды F2-F1). В своем нативном состоянии F-белок заякорен в мембране трансмембранной спиралью в С-концевой области. Дополнительными признаками полипептида F₀ являются 15 остатков цистеина, 4 характерных эпитопа нейтрализации, 2 двухспиральных области и мотив липидизации. Фиг. 1В иллюстрирует характерные признаки примеров антигенов PreF. Чтобы сконструировать антиген PreF, полипептид F₀ модифицировали, чтобы стабилизировать имеющуюся до слияния конформацию F-белка, таким образом сохраняя доминантные иммуногенные эпитопы F-белка, которые презентуются вирусом РСВ перед связыванием и слиянием с клетками-хозяевами. Следующие стабилизирующие мутации вводили в антиген PreF по сравнению с полипептидом F₀. Во-первых, стабилизирующий суперспирализованный домен помещали на С-конце внеклеточного домена полипептида F₀, заменяя заякоривающий в мембране домен F₀. Во-вторых, удаляли пептид pep27 (расположенный между доменами F2 и F1 в нативном белке). В-третьих, удаляли оба мотива для фурина. В альтернативных вариантах (обозначенных PreF_V1 и PreF_V2) к С-концевому домену добавляли иммунологически активную часть (например, аминокислоты 149-229) G-белка РСВ.

В других вариантах вводили модификации, чтобы изменить (увеличить или уменьшить) гликозилирование и/или уменьшить расщепление протеазой, отличной от фурина.

Пример 2. Получение и очистка рекомбинантного белка PreF из клеток СНО.

Рекомбинантную полинуклеотидную последовательность, кодирующую иллюстративный антиген PreF, вводили в клетки-хозяева СНО для получения антигена PreF. Временно трансфицированные клетки-хозяева или размноженные стабильные популяции, содержащие введенную полинуклеотидную последовательность, выращивали в среде и в условиях, подходящих для роста в соответствующем масштабе для требуемой цели (например, как в общем описано в публикации Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition, Wiley-Liss, New York и цитированных в указанной публикации ссылок). Обычно клетки выращивают в бессывороточной среде во встряхиваемых флаконах при 37°C с 5% CO₂ и пересевают с интервалами в 2-3 дня или выращивают в биореакторах при 29°C с pO₂, поддерживаемым на уровне 20%.

Чтобы извлечь рекомбинантный антиген PreF, культуру клеток центрифугируют и надсадок культуры клеток хранят примерно при -80°C вплоть до использования. Для дальнейшего анализа аликвоты культуры клеток объемом 2 л разбавляли в 2 раза очищенной водой и значение pH доводили до 9,5, используя NaOH. Надсадок загружали со скоростью 14 мл/мин на ионообменную колонку с Q-сефарозой FF (60 мл, 11,3 см), уравновешенную в 20 mM пиперазине, pH 9,5. После промывки колонки начальным буфером осуществляли элюирование градиентом NaCl от 0 до 0,5 M NaCl 20 об. колонки (объем фракций 10 мл). Фракции анализировали, используя SDS-ПААГ-гель с окрашиванием серебром и Вестерн-блот. Затем фракции, содержащие основную часть белка PreF, объединяли перед дальнейшей обработкой.

В объединенных элюированных фракциях со стадии Q step (~130 мл) заменяли буфер на 10 mM фосфат, pH 7,0, используя лабораторную систему TFF Millipore с мембранной кассетой Pellicon XL PES Biotech 100 (предел отсечения по М.м. 10000 кД). Полученный материал имел pH 7,0 и проводимость 1,8 мСм/см. 100 мл такого образца нагружали со скоростью 5 мл/мин на гель гидроксипатита типа II (НА ТII) объемом 10 мл (ХК 16, высота=5 см), уравновешенный 10 mM PO₄ (Na)-буфером, pH 7,0. После промывки колонки начальным буфером осуществляли элюирование, используя градиент от 10 до 200 mM PO₄ (Na), pH 7,0 в 20 об. колонки. Фракции снова анализировали в SDS-ПААГ с окрашиванием серебром и Кумасси синим и позитивные фракции объединяли.

После аффинной хроматографии объединенные фракции концентрировали и буфер заменяли на DPBS (pH ~7,4), используя блок для концентрирования Vivaspin 20, предел отсечения по молекулярной массе 10000 кД. Объем конечного продукта составлял примерно 13 мл. Концентрация белка составляла 195 мкг/мл, как было определено с использованием анализа по Лоури. Чистота составляла более 95%. Такой очищенный препарат антигена PreF стерильно фильтровали и хранили при -20°C до использования.

Пример 3. Характеристика рекомбинантного белка PreF, полученного в клетках CHO.

Рекомбинантный белок PreF, полученный в клетках CHO, характеризовали, используя проточное фракционирование в асимметричном поле (AFF-MALS), и сравнивали с химерным антигеном, содержащим F-белковые и G-белковые компоненты PCB. AFF-MALS обеспечивает возможность разделения видов белков в соответствии с размером их молекул в потоке жидкости с минимальным взаимодействием с матриксом и дополнительный анализ с использованием многоугольного светорассеяния для точного определения молекулярной массы. На фиг. 2А показано, что более чем 65% очищенного FG-материала находится в виде высокомолекулярных олигомеров (1000-100000 кД) в конечном буфере PBS, при этом 3% остается в мономерной форме.

На фиг. 2В показано, что до 73% очищенного белка PreF подвергается фолдингу в свою тримерную форму в PBS-буфере. 10% материала находится в виде олигомеров с молекулярной массой от 1000 до 20000 кД. Полученные результаты показывают, что рекомбинантный белок PreF, экспрессированный в клетках CHO, подвергается фолдингу в виде тримера, как прогнозируется для нативного состояния.

Очищенный белок PreF также поперечно сшивали, используя глутаральдегид, с двумя целями: подтвердить растворимую природу белка в растворе фосфатного буфера и создать агрегаты для сравнительной оценки *in vivo* с FG-белком (см. пример 7 ниже). Использование поперечного сшивания глутаральдегидом известно для осуществления хорошей оценки четвертичной структуры белка и описано в публикациях *Biochemistry*, 36: 10230-10239 (1997); *Eur. J. Biochem.*, 271: 4284-4292 (2004)).

Белок инкубировали с 1, 2 и 5% поперечно сшивающего агента глутаральдегида в течение 4 ч при 4°C и реакцию блокировали добавлением NaBH₄. Избыток глутаральдегида удаляли обессоливанием на колонке в PBS-буфере. Полученный белок количественно оценивали на основе оптической плотности при 280 нм и оценивали в SDS-ПААГ в денатурирующих и восстанавливающих условиях. Было определено, что основанная часть очищенного рекомбинантного PreF мигрирует в виде тримера в растворе PBS. Повышение температуры инкубации до 23°C требовалось для превращения большей части тримерного белка в высокомолекулярные агрегаты, как было подтверждено с использованием SDS-ПААГ.

Пример 4. Ингибирование нейтрализации *in vitro* антигеном антиген PreF.

Сыворотку человека, полученную от добровольцев, подвергали скринингу в отношении реактивности против PCB А в ELISA и использовали в анализе ингибирования нейтрализации (NI) в соответствующем разведении на основании предварительного титрования потенциала нейтрализации PCB, установленного для каждого образца сыворотки. Коротко, сыворотку смешивали с белками-ингибиторами (PreF или контрольным белком, по существу, соответствующим химерному FG, описанному в патенте США № 5194595, названному RixFG) в концентрациях 25 мкг/мл в DMEM с 50% средой 199-Н, содержащей 0,5% FBS, 2 мМ глутамин, 50 мкг/мл гентамицина (все препараты из Invitrogen), и инкубировали в течение 1,5-2 ч при 37°C на вращающемся столике. 20 мкл разведенной сыворотки и белков смешивали в 96-луночной планшете с круглым дном с PCB А, оттитрованным для оптимизации диапазона ингибирования для каждого образца сыворотки. Полученные смеси инкубировали в течение 20 мин при 33°C в 5% CO₂, чтобы поддерживать pH.

Смеси сыворотка-ингибитор-вирус затем помещали в предварительно засеянные клеткам Vero 96-луночные планшеты с плоским дном и инкубировали в течение 2 ч при 33°C перед добавлением 160 мл среды. Затем планшеты инкубировали в течение 5-6 дней при 33°C с 5% CO₂ вплоть до анализа иммунофлуоресценции для определения титра NI. После фиксации в течение 1 ч 1% параформальдегидом в фосфатно-солевом буфере (PBS) планшеты блокировали 2% молоком/PBS и буфером для блокирования. Антитело козы против PCB (Biodesign Internation; 1:400) добавляли в каждую лунку без промывки и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре (КТ). Образцы промывали 2 раза в PBS и в лунки добавляли антитело против IgG козы, конъюгированное с ФИТЦ (Sigma; 1:400) в блокирующем буфере. Планшеты снова инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре и промывали 2 раза, как указано выше, перед регистрацией. Лунку считали позитивной, когда регистрировали >1 флуоресцирующего синцития. Вычисления 50% инфицирующую дозу для культуры ткани (TCID₅₀) осуществляли, используя способ Спирмана-Кербера (SK), и процент NI вычисляли следующим образом: [(титр нейтрализации при 0 мкг/мл ингибитора - титр нейтрализации при 25 мкг/мл ингибитора)/титр нейтрализации при 0 мкг/мл ингибитора]×100. Примеры результатов, показанных на фиг. 3, свидетельствуют, что PreF превосходит FG в NI у 16/21 тестируемых доноров.

Пример 5. Антиген PreF является иммуногенным.

Чтобы показать иммуногенность антигена PreF мышей дважды иммунизировали внутримышечно с двухнедельным интервалом, используя preF (6,5, 3,1, 0,63, 0,13 и 0,025 мкг/мл) и Th1-адьювант, содержащий 3D-MPL и QS21 в соотношении 1/20 на дозу для человека ("AS01E") или preF (1, 0,2 и 0,04 мкг/мл) и Th1-адьювант, содержащий 3D-MPL и квасцы в соотношении 1/10 на дозу для человека ("AS04C"), и спустя три недели собирали сыворотку. Титр антиген-специфичных IgG-антител определяли в объединенных образцах сыворотки в ELISA согласно стандартным способам. Коротко, 96-луночные планшеты покрывали очищенным инактивированным PCB А, PCB В и гомологичным preF-белком и инкубировали в течение ночи при 4°C. Образцы сыворотки серийно разбавляли в блокирующем буфере, начиная с исходной концентрации 1:50, вместе с очищенным IgG мыши (Sigma, ON) в начальной кон-

центрации 200 нг/мл и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Связанное антитело выявляли, используя конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP) антитело против IgG мыши (Sigma, ON). 3,3А,5,5А-тетраметилбензидин (ТМБ, BD Opt ElATM, BD Biosciences, ON) использовали в качестве субстрата для HRP. 50 мкл 1 М H₂SO₄ добавляли в каждую лунку, чтобы остановить реакцию. Значения оптической плотности для каждой лунки регистрировали при 450 нм, используя считывающее устройство для микропланшетов Molecular Devices (Molecular Devices, USA).

Типичные результаты, подробно изображенные на фиг. 4А и 4В, оказывают, что было вызвано образование высоких титров против РСВ А и РСВ В после иммунизации антигеном PreF.

Пример 6. PreF вызывает образование нейтрализующих антител.

Наличие и количество нейтрализующих антител оценивали в образцах сыворотки мышей, иммунизированных, как описано выше в примере 5. Объединенные сыворотки от иммунизированных животных серийно разбавляли, начиная с исходного разведения 1:8 в среде для РСВ в 96-луночных планшетах (20 мкл/лунку). Контрольные лунки содержали только среду для РСВ или антитело козы против РСВ в разведении 1:50 (Biodesign international). 500-1000 инфицирующих доз типичного штамма РСВ А или В добавляли в лунки и планшеты инкубировали в течение 20 мин при 33°C, 5% CO₂, затем смесь переносили в 96-луночные планшеты с плоским дном, предварительно засеянные клетками Vero в концентрации 1×10⁵ клеток/мл. Клетки инкубировали примерно в течение 2 ч при 33°C, 5% CO₂, и повторно подпитывали, затем инкубировали в течение 5-6 дней при такой же температуре. Надосадки удаляли; планшеты промывали PBS и прикрепленные клетки фиксировали 1% параформальдегидом в PBS в течение 1 ч с последующей непрямой иммунофлуоресценцией (IFA) с использованием первого антитела козы против РСВ и антитела против IgG козы-ФИТЦ для регистрации.

Типичные результаты, показанные на фиг. 5А и 5В, соответственно демонстрируют, что значимые нейтрализующие антитела против обоих штаммов РСВ выявлены в сыворотке животных, иммунизированных preF.

Пример 7. PreF защищает от заражения РСВ.

Мышей дважды иммунизировали внутримышечно с двухнедельным интервалом, как описано выше, и заражали через три недели после второй инъекции, используя РСВ А. Защиту от РСВ оценивали, измеряя вирус, присутствующий в легких после заражения. Коротко, легкие от иммунизированных животных асептически извлекали после эвтаназии и промывали в среде для РСВ, используя 2 об. по 10 мл/легкое в пробирках объемом 15 мл. Затем легкие взвешивали и гомогенизировали по отдельности в среде для РСВ, используя автоматизированный гомогенизатор Поттера (Fisher, Nerean ON), и центрифугировали при 2655×g в течение 2 мин при 4°C. Вирус, присутствующий в надосадках, титровали, используя серийные разведения (восемь повторов, начиная с 1:10), на предварительно посеянном монослое клеток Vero (ATCC № CCL-81) в 96-луночных планшетах и инкубировали в течение 6 дней. РСВ регистрировали с помощью непрямой IFA после фиксации в 1% параформальдегиде/PBS, pH 7,2, используя первое антитело козы против РСВ и ФИТЦ-меченое второе антитело против IgG козы.

Типичные результаты, показанные на фиг. 6А и 6В, демонстрируют, что дозы, равные или превышающие 0,04 мкг при введении в присутствии адьюванта вызывают мощную защиту от РСВ.

Пример 8. PreF не индуцирует рекрутинг эозинофилов в легких после заражения.

Чтобы оценить способность антигена PreF провоцировать обостренное заболевание после иммунизации и последующего заражения, группы мышей (5 мышей/групп) дважды иммунизировали, каждый раз используя (а) 10 мкг обработанного глутаральдегидом preF, (b) 10 мкг preF или (с) 10 мкг FG без адьюванта. Мышей заражали РСВ А через 3 недели после бустер-иммунизации и бронхоальвеолярный лаваж (BAL) осуществляли через 4 дня после заражения. Суммарные инфильтраты лейкоцитов в BAL подсчитывали на мыш, а также осуществляли дифференциальные подсчеты (300 клеток) на основе морфологии клеток макрофагов/моноцитов, нейтрофилов, эозинофилов и лимфоцитов.

Суммарные количества клеток умножали на разные проценты эозинофилов для каждого животного. Представлены геометрические средние для группы с 95% доверительными интервалами. Типичные результаты, показанные на фиг. 7, демонстрируют, что эозинофилы не подвергаются рекрутингу в легкие после иммунизации preF и заражения. Кроме того, полученные результаты свидетельствуют, что растворимая природа антигена PreF по сравнению со специально агрегированной формой preF (обработка глутаральдегидом) или антигеном FG (природно агрегированный) не благоприятствует эозинофилам.

Пример 9. Иммуногенность антигена PreF, приготовленного с разведениями адьюванта в виде эмульсии типа масло-в-воде.

Мыши получали 250 нг preF, приготовленного в виде препарата с иллюстративным адьювантом типа масло-в-воде, AS03A, в дозе, составляющей 1/10 от "полной" дозы для человека (AS03A), 10,70 мг сквалена, 11,88 мг DL-α-токоферола, 4,85 мг полисорбата 80, 1/2 дозы (AS03B), 1/4 дозы (AS03C) или без адьюванта. Контрольные мыши получали только AS03A или PBS. Мышей иммунизировали в 0 и 14 день. Сбор крови, спленоцитов и заражение осуществляли на 39 день (25 день после 2 дозы). Легкие гомогенизировали для титрования РСВ через 4 дня после заражения.

Титры антиген-специфичных IgG-антител определяли в отдельных образцах сыворотки в ELISA.

Коротко, 96-луночные планшеты покрывали очищенным инактивированным РСВ А и инкубировали в течение ночи при 4°C. Образцы сыворотки серийно разбавляли в блокирующем буфере, начиная с разведения 1:200, вместе с очищенным IgG мыши (Sigma, ON) в начальной концентрации 200 нг/мл и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Связанное антитело выявляли, используя конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP) антитело против IgG мыши (Sigma, ON). 3,3А,5,5А-тетраметилбензидин (ТМВ, BD Opt EIAM, BD Biosciences, ON) использовали в качестве субстрата для HRP. 50 мкл 1 М H₂SO₄ добавляли в каждую лунку, чтобы остановить реакцию. Значения оптической плотности для каждой лунки регистрировали при 450 нм, используя считывающее устройство для микропланшетов Molecular Devices (Molecular Devices, USA). Результаты показаны на фиг. 8. Концентрацию IgG против РСВ примерно 250000 нг/мл наблюдали в сыворотке мышей, иммунизированных ргеF в сочетании с AS03А, AS03В или AS03С, при этом очень низкую концентрацию (1828 нг/мл) наблюдали в сыворотке мышей, иммунизированных одним ргеF.

Объединенные сыворотки от иммунизированных животных серийно разбавляли, начиная с исходного разведения 1:8 в среде для РСВ в 96-луночных планшетах (20 мкл/лунку). Контрольные лунки содержали только среду для РСВ или антитело козы против РСВ в разведении 1:50 (Biodesign international). Добавляли штамм РСВ Long, планшеты инкубировали в течение 20 мин при 33°C и смесь переносили в 96-луночные планшеты с плоским дном, предварительно засеянные клетками Vero в концентрации 1×10⁵ клеток/мл. После 5-6 дней инкубации при такой же температуре надосадки удаляли; планшеты промывали PBS и прикрепленные клетки фиксировали 1% параформальдегидом в PBS в течение 1 ч с последующей непрямой иммунофлуоресценцией (IFA). На фиг. 9 показано, что независимо от количества AS03, вводимого в сочетании с ргеF, титры нейтрализующих РСВ антител сохранялись одинаковыми (~11 log₂), тогда как титры нейтрализующих РСВ антител у мышей, иммунизированных без AS03, были значительно ниже (~6 log₂).

Легкие от иммунизированных животных асептически извлекали после эвтаназии и промывали в среде для РСВ, используя 2 об. по 10 мл/легкое в пробирках объемом 15 мл. Затем легкие взвешивали и гомогенизировали по отдельности в среде для РСВ, используя автоматизированный гомогенизатор Поттера (Fisher, Nerean ON), и центрифугировали при 2655×g в течение 2 мин при 4°C. Титровали вирус, присутствующий в надосадках. Коротко, гомогенаты легких серийно разбавляли в восьми повторах, начиная с 1:10, на предварительно посеянном монослое клеток Vero (ATCC № CCL-81) в 96-луночных планшетах и инкубировали в течение 5-6 дней. РСВ регистрировали с помощью непрямой IFA. Фиг. 10 иллюстрирует результаты, показывающие, что не наблюдалось различий в защите между мышами, иммунизированными ргеF в сочетании с AS03А, AS03В или AS03С, тогда как более слабую защиту наблюдали у мышей, иммунизированных без AS03.

Полученные результаты показывают, что антиген ргеF может быть приготовлен с использованием широкого диапазона концентраций адьюванта для получения композиции, которая вызывает иммунный ответ против РСВ.

Список последовательностей

SEQ ID NO: 1

Нуклеотидная последовательность, кодирующая эталонный белок слияния PCB

Штамм A2, № доступа в GenBank U50362

atggagttgctaatacctcaaaagcaaatgcaattaccacaatcctcactgcagtcacat
 ttgttttgccttctggcctcaaacatcactgaagaattttatcaatcaacatgcagtgtagtagc
 aaaggctatccttagtgctctgagaactgggttggtataaccagtggtataactatagattaagta
 atatcaaggaaaataagtgtaatggaacagatgctaaggtaaaattgataaacaagaattaga
 taaatataaaaaatgctgtaacagaattgcagttgctcatgcaaaagcaccagcaacaacaat
 cgagccagaagagaactaccaaggtttatgaattatacactcaaaatgccaaaaaaccaatg
 taacattaagcaagaaaaggaaaagaagatttcttggtttttgttaggtgtggatctgcaat
 cgccagtggtgctgctgctatctaaggtcctgcacctgaaggggaagtgaacaagatcaaaagt
 gctctactatccacaacaaggctgtagtcagttatcaaatggagttagtgcttaaccagca
 aagtggttagacctcaaaaactatatagaaaacaattgttacctattgtgaacaagcaagctg
 cagcatatcaaatatagcaactgtatagagttccaacaaaagaacaacagactactagagatt
 accagggaaatttagtgtaagcaggtgtaactacacctgtaagcacttacatgttaactaata
 gtgaattattgtcattatcaatgatatgcctataacaaatgatcagaaaaagttaatgtccaa
 caatgttcaaatgtagacagcaaaagtactctatcatgtccataataaaagaggaagtctta
 gcatatgtgtacaattaccactatatgggtgtatagatacacacctgttgaaactacacacat
 cccctatgtacaaccaacacaaaagaagggtccaacatctgtttaacaagaactgacagagg
 tggtagctgtgacaatgcaggatcagtatcttctcccacaagctgaaacatgtaaagtcaat
 caaatcgagtatttgtgacacaatgaacagtttaacattaccaagtgaagtaaaactctgcaa
 tgttgacatattcaaccccaaatatgattgtaaaattatgacttcaaaaacgatgtaagcagc
 tcggtatcacatctctaggagccattgtgtcatgctatggcaaaacaaatgtacagcatcca
 ataaaaatcgtggaatcataaagacattttctaacgggtgcatatgtatcaataaaaggggt
 ggacactgtgtctgtaggtaacacattatattatgtaaaaagcaagaaggtaaaagtctctat
 gtaaaagggtgaaccaataataaatttctatgacccttagtattcccctctgatgaattgatg
 catcaatatctcaagtcaacgagaagattaacagagcctagcattattctgtaaatccgatga
 attattacataatgtaaatgctggtaatccaccataaataatcatgataactactataattata
 gtgattatagtaaatattgttatcttaattgctgttgactgctcttatactgtaaggccagaa
 gcacaccagtcacactaagaagatcaactgagtggtataaataatattgcatttagtaacta
 a

SEQ ID NO: 2

Аминокислотная последовательность эталонного предшественника F-белка F0 PCB

Штамм A2, № доступа в GenBank AAB86664

MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVIT
 IELSNIKENKCNQTDKAVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNN
 AKKTNVTLKRRKRRFLGFLGVSASIASGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVLSNG
 VSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPIVKNQSCSISNIATVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPV
 STYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKMLSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVID
 TPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAEKCKVQSNRVFCDTMNSL
 TLPSEVNLNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYKTKCTASNKNRGIKTF
 NGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKI
 NQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTINIMITTIIIVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSK
 QLSGINNIAFSN

SEQ ID NO: 3

Нуклеотидная последовательность, кодирующая эталонный G-белок PCB

Штамм Long

Atgtccaaaaacaaggaccaacgcaccgctaagacactagaaaagacctgggacactc
tcaatcatttattattcatatcatcgggcttatataagttaaactctaaatctatagcaca
tcacattatccattcttgcaatgataatctcaacttcacttataattacagccatcatattca
tagcctcggcaaacccacaagtcaactaacaactgcaatcatacaagatgcaacaagccaga
tcaagaacacaacccccacatacctcactcaggatcctcagcttggaaatcagcttctccaatc
tgtctgaaattacatcacaacaccaccatactagcttcaacaacaccaggagtcaagtcaa
acctgcaaccacacaacagtcaagactaaaaacacaacaacaccccaacacaacccagcaagc
ccactacaaaaacaacgcaaaacaaaccaccaaacaacccaataatgattttcacttcaag
tgtttaactttgtaccctgcagcatatgcagcaacaatccaacctgctgggctatctgcaaaa
gaatacacaacaaaaaacaggaaagaaaaccaccaccaagcctacaaaaaaccaacctca
agacaacccaaaaagatctcaaacctcaaacactaaaccaaaggaagtaccaccaccaagc
ccacagaagagccaacctcaacaccacaaaaacaacatcacaactacactgctcaccaaca
acaccacaggaatccaaaactcacaagtcaaatggaacaccttccactcaacctcctccgaag
gcaatctaagcccttctcaagtctccacaacatccgagcaccatcacaacctcatctccac
ccaacacaacacgccagtag

SEQ ID NO: 4

Аминокислотная последовательность эталонного G-белка PCB

MSKNKDQRTAKTLEKTWDTLNHLLFISSGLYKLNKLSIAQITLSILAMIISTSLIITA
IIFIASANHKVTLTTAIIQDATSQIKNTTPTYLTQDPQLGISFNSLSEITSQTTILASTTPG
VKSNLQPTTVKTKNTTTTQTQPSKPTTKQRQNKPNKPNNDFFHEVFNFPVPCSI CSNNPTCWA
ICKRIPNKKPGKKTTKPTKPTFKTTKKDLKPQTTPKEVPTTKPTEPTINTTKINIITTL
LTNNTTGNPKLTSQMETFHSTSSSEGNLSPSQVSTTSEHPSQPSSPPNTTRQ

SEQ ID NO: 5

Нуклеотидная последовательность аналога PreF, оптимизированного для CHO

aagcttgccaccatggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcacccgcatcctgg
ccgccgtgaccctgtgcttcgcctcctcccagaacatcacccaggagttctaccagtcacct
gctccgctgttccaagggtacctgtccgcctgcccggaccggctggtacacctccgtgatca
ccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgcaacggcaccgacgccaaggtgaagctga
tcaagcaggagctggacaagtacaagagcgcctgaccgaactccagctgctgatgcagctca
ccctgccaccaacaacaagtttctgggcttcctgctggcgctgggctccgcatcgctccg
gcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaagagcgcctgc

tgtccaccaacaaggccgtgggtgtccctgtccaacggcgtgtccgtgctgacctccaaggtgc
 tggatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgatgaacaagcagtcctgctcca
 tctccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagatcacc
 gcgagttctccgtgaacgcccggcgtgaccaccctgtgtccacctacatgctgaccaactccg
 agctgctgtccctgatcaacgacatgcctatcaccacgaccagaaaaactgatgtccaaca
 acgtgcagatcgtgcccagcagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaggtgctgg
 cctacgtggcagctgcctctgtacggcgtgatcgacacccttctggaagctgcacacct
 cccccctgtgcaccaccaaccaaggagggtccaacatctgcctgacccggaccgaccggg
 gctgggtactgcgacaacgcccgtccgtgtccttctccctctggccgagacctgcaaggtgc
 agtccaaccgggtgttctgcgacaccatgaactccctgacctgccttccgaggtgaacctgt
 gcaacatcgacatcttcaacccaagtacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgt
 cctccagcgtgatcacctccctggcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgaccg
 cctccaacaagaaccggggaatcatcaagaccttctccaacggctgcgactacgtgtccaata
 agggcgtggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcaggagggaaga
 gcctgtacgtgaaggcgagcctatcatcaacttctacgacctctgggttcccttccgacg
 agttcgacgctccatcagccaggtgaacgagaagatcaaccagtcctggccttcatccgga
 agtccgacgagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctacc
 acatcgagaacgagatcgcccggatcaagaagctgatcggcgaggcctgataatctaga

SEQ ID NO: 6

Аминокислотная последовательность аналога PreF

MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVIT
 IELSNIKENKCNNGTDAKVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGLLGVGSAIASG
 IAVSKVLHLEGEVVKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQSCSI
 SNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPIITNDQKLMNSN
 VQIVRQSYSIMSI I KEV LAYV VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRG
 WYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVS
 SSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI I KTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKS
 LYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEILSKIYH
 IENEIARIKKLIGEA

SEQ ID NO: 7

Нуклеотидная последовательность, кодирующая PreFG_V1, оптимизированный для CHO

aagcttgccaccatggagctgctgatcctcaagaccaacgccatcaccgccatcctgg
 ccgccgtgacctgtgcttcgcctcctcccagaacatcaccgaagagttctaccagtcacct
 gctccgcccgtgtccaagggtacctgtccgcccctgggaccggctggtagacctccgtgatca
 ccatcgagctgtccaacatcaagaaaacaagtgcaacggcaccgacgccaaggtcaagctga

tcaagcaggaactggacaagtacaagagcgccgtgaccgaactccagctgctgatgcagtcca
 ccctgccaccaacaacaagaagttctgggcttctgctggcggtgggctccgccatcgct
 ccggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggaggcgaggtgaacaagatcaagagcgccc
 tgctgtccaccaacaaggccgtggtgtccctgtccaacggcgtgtccgtgctgacctccaagg
 tgctggatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgtgaacaagcagtcctgct
 ccatctccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagatca
 ccgcgagttctccgtgaacgccggcgtgaccacccctgtgtccacctacatgctgacaaact
 ccgagctgctctccctgatcaacgacatgcctatcaccaacgaccaaaaaagctgatgtcca
 acaacgtgcagatcgtgcccagcagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaagtc
 tggcctacgtcgtgcagctgcctctgtacggcgtgatcgacacccttgctggaagctgcaca
 cctccccctgtgcaccaccaacaccaaaggggctccaacatctgctgaccggaccgacc
 gggcgtggtactgcgacaacgccggctccgtgtccttctccctctggcggagacctgcaagg
 tgcagtccaaccgggtgttctgcgacaccatgaactcctgaccctgccttccgaggtgaacc
 tgtgcaacatcgacatcttcaaccccaagtcgactgcaagatcatgaccagcaagaccgacg
 tgcctccagcgtgatcacctcctggcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgc
 ccgctccaacaagaaccggggaatcatcaagaccttctccaacggctgcgactacgtgtcca
 ataaggcgtggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcaggaaggca
 agagcctgtacgtgaaggcgagcctatcatcaacttctacgacctctgggtgtccctccg
 acgagttcgacgcctccatcagccaggtcaacgagaagatcaaccagtcctcctggccttcc
 ggaagtcgacgagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaagagatcctgtccaaaatct
 accacatcgagaacgagatcgcccggatcaagaagctgatcggcgaggctggcggtctggcg
 gcagcggcggtccaagcagcggcagaacaagcctcctaacaagccaacaacgacttccact
 tcgaggtgttcaactcgtgccttgcctcatctgctccaacaaccctacctgctgggcatct
 gcaagagaatccccacaagaagcctggcaagaaaaccaccaagcctaccaagaagccta
 ccttcaagaccaccaagaaggaccacaagcctcagaccacaagcctaaggaagtccaacca
 ccaagcaccaccaccatcaccactgataatcta

SEQ ID NO: 8

Пептид PreFG_V1 для CHO

MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVIT
 IELSNIKENKCNNGTDAKVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGFLLGVSIAIAS
 GIAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLSNVSVLTSKVLDLKNIIDKQLLPVKNQSCS
 ISNIETVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTFPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKLMNS
 NVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDR
 GWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNIDIFNPKYDCKIMTSKTDV
 SSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFNNGCDYVSNKGVDTVSVGNLTYVKNQEGK
 SLYVKGEPIINFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIY

HIENEIARIKKLIGEAGSGSGGSKQRQNKPPNKPNNDFHFEVFNFPVPCISCSNNPTCWAIC
KRIPNKKPGKKTTTKPTKKPTFKTTKKDHKPQTTPKPEVPTTK

SEQ ID NO: 9

Нуклеотидная последовательность, кодирующая PreFG_V2 для
СНО

aagcttgccaccatggagctgctgatoctcaagaccaacgcatcaccgcatcctgg
ccgcegtgaccctgtgcttcgcctcctcccagaacatcaccgaagagttctaccagtccacct
gctccgcegtgtccaagggtacctgtccgacctgaggaccggtggtacacctccgtgatca
ccatcgagctgtccaacatcaaagaaaacaagtgcaacggcaccgacgccaaggtcaagctga
tcaagcaggaactggacaagtacaagagcgccgtgaccgaactccagctgctgatgcagtcga
ccccctgccaccaacaacaagaagttctgggcttcctgctgggctgggctccgcatcgct
ccggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaagagcgccc
tgetgtccaccaacaaggccgtggtgtccctgtccaacggcgtgtccgtgctgacctccaagg
tgctggatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgtgaacaagcagtcctgct
ccatctccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagatca
ccccgagttctccgtgaacgccggcgtgaccacctgtgtccacctacatgctgacaaact
ccgagctgctctccctgatcaacgacatgcctatcaccaacgacaaaaaaagctgatgtcca
acaacgtgcagatcgtgcccagcagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaagtc
tggcctacgtcgtgacgtgctctgtacggcgtgatcgacaccttgctggaagctgcaca
cctccccctgtgaccaccaacaccaaagagggtccaacatctgctgacctggaccgacc
gggctggtactgcaacaacgccggtccgtgtccttcttccctctggccgagacctgcaagg
tgagctccaaccgggtgttctgcaacacctgaactccctgacctgccttccgaggtgaacc
tgtgcaacatcgacatcttcaacccaagtacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgacg
tgtcctccagcgtgatcacctccctgggcccacgtgtcctgctacggcaagaccaagtgca
ccgctccaacaagaaccggggaatcatcaagaccttctccaacggctgagactacgtgtcca
ataaggcgtggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcaggaaggca
agagcctgtacgtgaaggcgagcctatcatcaacttctacgacctctgggttcccttccg
acgagttcgacgcctccatcagccaggtcaacgagaagatcaaccagtcctggccttcatcc
ggaagtccgacgagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaagagatcctgtccaaaatct
accacatcgagaacgagatcgccccgatcaagaagctgatcgccgaggtggcgcaagcagc
ggcagaacaagcctcctaacaagcccaacaacgacttccactcgaggtgttcaactcgtgc
cttgcctcatctgctccaacaacctacctgctgggcatctgcaagagaatccccacaaga
agcctggcaagaaaaccaccaccaagcctaccaagaagcctaccttcaagaccaccaagaagg
accacaagcctcagaccacaagcctaaggaagtccaaccaccaagcaccaccacctcacc
actgataatcta

SEQ ID NO: 10

Пептид PreFG_V2 для CHO

MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVIT
 IELSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNKKFLGFLLVGSAIAS
 GIAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQSCS
 ISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSLESLINDMPITNDQKKLMSN
 NVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDR
 GWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNIDIFNPKYDCKIMTSKTDV
 SSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSGNTLYYVVKQEGK
 SLYVKGEPINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIY
 HIENEIARIKKLIGEAGGKQRQNKPPNKNDFHFEVFNFPVPCISCSNNPTCWAICKRIPNKK
 PGKKTTHKPTKPTFKTKKDHKQPQTKPKVPTTK

SEQ ID NO: 11

Иллюстративная суперспираль (изолейциновая молния)

EDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEAGGKQRQNKPPNKNDFHFEVFNFPVPCISCSNNPTCWAICKRIPNKK

SEQ ID NO: 12

Полинуклеотид антигена PreF CHO2

atggagctgccccatcctgaagaccaacgcatcaccaccatcctcgccgctgaccc
 tgtgcttcgccagcagccagaacatcacggaggagtctaccagagcacgtgcagcgcctga
 gcaagggctacctgagcgcgctgcgcacgggctggtacacgagcgtgatcacgatcgagctga
 gcaacatcaaggagaacaagtgaacggcagcgcgaaggtgaagctgatcaagcaggagc
 tggacaagtacaagagcgcggtgacggagctgcagctgctgatgcagagcacgcccgcgca
 acaacaagttcctcgcttcctgctgggctgggagcgcgatcgcgagcggcatcgccgtga
 gcaaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaagtcgagcgtgctgagcacgaaca
 agcggctgctgagcctgagcaacggcgtgagcgtgctgacgagcaaggtgctgcacctgaaga
 actacatcgacaagcagctgctgccgatcgtgaacaagcagagctgcagcatcagcaacatcg
 agaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccgctgctggagatcacgcgggagttctccg
 tgaacgcagcgtgacgacgcccgtgtctacgtacatgctgacgaacagcagcgtgctcagcc
 tgatcaacgacatgccgatcacgaacgaccagaagaagctgatgagcaacaacgtgcagatcg
 tgcgccagcagagctacagcatcatgagcatcatcaaggaggaggtgctggcatacgtggtgc
 agctgccgctgtacggcgtcatcgacacgcctgctggaagctgcacacgagcccgtgtgca
 cgaccaaacgaaggaggcagcaacatctgcctgacgcggacggaccggggctggtactgca
 acaacgcgggcagcgtgagcttcttcccgtcgcgagagcgtgcaaggtgcagagcaaccgca
 tcttctgacacgatgaacagcctgacgctgccgagcaggtgaacctgtgcaacatcgaca
 tcttcaaccgaagtacgactgcaagatcatgacgagcaagaccgatgtcagcagcagcgtga
 tcacgagcctcggcgcgatcgtgagctgctacggcaagcgaagtgacggcgagcaacaaga
 accgcccgcacatcaagcgttcagcaacggctgacgactatgtgagcaacaagggcgtggaca

ctgtgagcgtcgcaacacgctgtactacgtgaacaagcaggaggcaagagcctgtacgtga
aggcgagcggatcatcaacttctacgaccgctcgtgttcccagcgcgaggttcgacgcga
gcatcagccaagtgaacgagaagatcaaccagagcctggcgttcatccgcaagagcgcgaga
agctgcacaacgtggaggacaagatcgaggagatcctgagcaagatctaccacatcgagaacg
agatcgcgcgcatcaagaagctgatcggcgaggcgcgcatcatcaccatcaccattga

SEQ ID NO: 13

Полинуклеотид антигена PreF с интроном

atggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcacccgcatcctggccgctgaccc
tgtgcttcgcctcctcccagaacatcacccgagggttctaccagtcacactgctccgctgtg
ccaagggtacctgtccgcctgcggaaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgt
ccaacatcaaggaaaacaagtgaacggcaccgacgccaaggatgaagctgatcaagcaggagc
tggacaagtacaagagcgcctgacccaactccagctgctgatgcagtcacccctgccacca
acaacaagtttctggcttctgctggcgtgggctccgccatcgctccggcatcgccgtga
gcaaggtacgtgtcgggacttggttcccccttttttaataaaaagttatatctttaatgta
tatacatatttctgtatgtgatccatgtgcttatgactttgtttatcatgtgttaggtgct
gcacctggaggggcagggtgaacaagatcaagagcgcctgctgtccaccaacaaggcctggt
gtccctgtccaacggcgtgtccgtgctgacctcaagggtgctggatctgaagaactacatcga
caagcagctgctgctatcgtgaacaagcagtcctgctccatctccaacatcgagaccgtgat
cgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagatcacccgcgagttctccgtgaacgcgg
cgtgaccacccctgtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctgtccctgatcaacga
catgctatcaccaacgaccagaaaaactgatgtccaacaacgtgcagatcgtgcggcagca
gtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagagggtgctggcctacgtgggtgcagctgctct
gtacggcgtgatcgacacccttgctggaagctgcacacctccccctgtgcaccaccaacac
caaggagggtccaacatctgctgacccggaccgacccgggctggtactgcgacaacgcgg
ctccgtgctcctctctccctctggccgagacctgcaagggtgcagtcacaaccgggtgtctgcga
caccatgaactccctgacctgcttccgagggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaacc
caagtacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcgtgatcacctccct
ggcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgcaccgctccaacaagaaccggggaat
catcaagaccttctccaacggctgcgactacgtgtccaataagggcgtggacaccgtgtccgt
gggcaacacactgtactacgtgaataagcaggaggcaagagcctgtacgtgaagggcgagcc
tatcatcaacttctacgacctctggtgtcccttccgacgagttcgacgcctccatcagcca
gggtgaacgagaagatcaaccagtcctggccttcatccggaagtccgacgagaagctgcataa
cgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacgagatcgcccg
gatcaagaagctgatcggcgaggccggagggtcaccaccaaccatcaccactga

SEQ ID NO: 14

Синтетическая линкерная последовательность

GGSGGSGGS

SEQ ID NO: 15

Сайт расщепления фурином

RARR

SEQ ID NO: 16

Сайт расщепления фурином

RKRR

SEQ ID NO: 17

Нуклеотидная последовательность, кодирующая PreF_NGTL

atggagctgctgatcctgaaaaccaacgcctaccgcatcctggcgcgctgaccc
 tgtgcttcgctcctcccagaacatcaccgaggagtctaccagtcacctgctccgctgtg
 ccaagggctacctgtccgcctgaggaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgt
 ccaacatcaaggaacaagtgcaacggcaccgacgccaaggtgaagctgatcaagcaggagc
 tggacaagtacaagagcgcctgaccgaactccagctgctgatgcagtcacccctgccacca
 acaacaagttctgggcttctgctggcgctggctccgccatcgctccggcatcgctgga
 gcaaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaagagcgcctgctgtccaccaaca
 aggcctgggtgtccctgtccaacggctgtccgtgctgacctccaaggtgctggatctgaaga
 actacatcgacaagcagctgctgcctatcgtagaacaagcagtcctgctccatctccaacatcg
 agaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagatcaccgaggttctccg
 tgaacgcccggctgaccaccctgtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctgtccc
 tgatcaacgcacatgcctatcaccaacgaccagaaaaaactgatgtccaacaacgtgcagatcg
 tggcgcagcagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaggtgctggcctacgtggtgc
 agctgctctgtacggcgtgatcgacaccccttgctggaagctgcacacctccccctgtgca
 ccaccaacaccaaggagggtccaacatctgcctgacccggaccgaccgggctggtaactgcg
 acaacgcccggctccgtgtccttctccctctggccgagacctgcaaggtgcagtcacaaccggg
 tgttctgagacacatgaactccctgaccctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgaca
 tcttcaaccccaagtacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcgtga
 tcacctcctggcgccatcggtgctgctacggcaagaccaagtgaccgcctccaacaaga
 accggggaatcatcaagaccttctccaacggctgcaactacgtgtccaataagggcgtggaca
 ccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcaggagggaagagcctgtacgtga
 agggcgagcctatcatcaacttctacgacctctgggtgtcccttccgacgagttcgacgcct
 ccatcagccaggtgaacgagaagatcaacgggaccctggccttcatccggaagtccgacgaga
 agctgcataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacg
 agatcgcccggatcaagaagctgatcggcgaggcc

SEQ ID NO: 18

Аминокислотная последовательность PreF_NGTL

MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVIT
 IELSNIKENKNGTDAKVLIKQELDKYKSAVTELQLMQSTPATNNKFLGFLLVGSAIASG
 IAVSKVLHLEGEVNIKIKSALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDLKNIYDKQLLPVVKQSCSI
 SNIETVIEFQQKNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN
 VQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLRTDRG
 WYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVS
 SSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKS
 LYVKGPEIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINGTLAFIRKSDEKLNVEDKIEEILSKIYH
 IENEIARIKKLIGEA

SEQ ID NO: 19

Нуклеотидная последовательность, кодирующая PreF_L112Q

atggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcacgccatcctggccgctgaccc
 tgtgcttcgcctcctcccagaacatcacggaggattctaccagtcacacctgctccgctgtg
 ccaagggtacctgtccgacctgaggaccggctggtacacctccgtgatcacctcgagctgt
 ccaacatcaaggaaaacaagtgcaacggcaccgacgccaaggtgaagctgatcaagcaggagc
 tggacaagtacaagagcgcctgacccaactccagctgctgatgcagtcacccccctgccacca
 acaacaagttctgggctcctgacgggctgggctccgccatcgctccggcatcgccgtga
 gcaaggtgctgcacctggaggcgaggtgaacaagatcaagagcgcctgctgtccaccaaca
 aggccgtggtgtccctgtccaacggcgtgtccgtgctgacctccaaggtgctggatctgaaga
 actacatcgacaagcagctgctgctatcgatgaacaagcagtcctgctccatctccaacatcg
 agacctgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagatcaccccgagttctccg
 tgaacgcccgtgaccacctgtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctgtccc
 tgatcaacgacatgcctatcaccaacgaccagaaaaactgatgtccaacaacgtgcagatcg
 tggcgagcagctcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaggtgctggcctacgtggtgc
 agctgcctctgtacggcgtgatcgacaccttgctggaagctgcacacctccccctgtgca
 ccaccaacaccaaggagggtccaacatctgctgacccggaccgaccggggtggtactgcg
 acaacgcccgtccgtgtccttctccctctggccgagacctgcaaggtgcagtcacaaccggg
 tgttctgcgacacccatgaactccctgacctgcttccgaggtgaaacctgtgcaacatcgaca
 tcttcaacccccagtagcactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcgtga
 tcacctccctggcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgaccgcctccaacaaga
 accggggaatcatcaagaccttccaacggctgagactacgtgtccaataaggcgtggaca
 ccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcaggagggaagacctgtacgtga
 agggcgagcctatcatcaacttctacgacctctggtgtcccttccgacgagttcgacgct
 ccatcagccaggtgaacgagaagatcaaccagtcctggccttcatccggaagtcgacgaga
 agctgcataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaatctaccacatcgagaacg
 agatcgcccggatcaagaagctgatcggcgaggcc

SEQ ID NO: 20

Аминокислотная последовательность Pref_L112Q

MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVIT
 IELSNIKENKCNNGTDAKVLIKQELDKYKSAVTELOLLMQSTPATNNKFLGFLQGVGSAIASG
 IAVSKVLHLEGEVNIKIKSALLSTNKAVVLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVKNQSCSI
 SNIETVIEFQQKNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN
 VQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRG
 WYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLTPSEVNL CNIDI FNPKYDCKIMTSKTDVS
 SSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQEGKS
 LYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYH
 IENEIARIKKLIGEA

SEQ ID NO: 21

Нуклеотидная последовательность, кодирующая
 Pref_NGTL_L112Q

atggagctgctgatcctgaaaaaccaacgccatcaccgccatcctggccgacctgaccc
 tgtgcttcgcctcctcccagaacatcaccgaggagttctaccagtcacactgctccgacctgt
 ccaaggctacctgtccgccctgaggaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgt
 ccaacatcaaggaaaacaagtgaacggcaccgacgccaaggtgaagctgatcaagcaggagc
 tggacaagtaacaagagcggcctgaccgaactccagctgctgatgcagtcacacctgcca
 acaacaagttctgggctcctgacggcggtgggctccgccatcgctccggcatcgccgtga
 gcaaggtgctgcacctggaggcgagggaacaagatcaagagcggcctgctgtccaccaaca
 aggcctggtgtcctgtccaacggcgtgctccgtgctgacctccaaggtgctggatctgaaga
 actacatcgacaagcagctgctgctatcgtgaacaagcagtcctgctccatctccaacatcg
 agaccgtgatcgagttccagcagaagaacaacggctgctggagatcaccgaggtctccg
 tgaacgcccggctgaccacctgtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctgtccc
 tgatcaacgacatgcctatcaccaacgaccagaaaaactgatgtccaacaacgtgcagatcg
 tggcggcagcagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaggtgctggcctacgtggtgc
 agctgcctctgtacggcgtgatcgacaccttgctggaagctgcacacctccccctgtgca
 ccaccaacaccaaggaggctccaacatctgcctgaccggaccgaccggggctggtactgcg
 acaacgcccggctccgtgtccttctccctctggccgagacctgcaaggtgcagtcacaacggg
 tgttctgagacacatgaactccctgacctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgaca
 tcttcaacccccagtagcactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcgtga
 tcacctcctggggccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgaccgacctccaacaaga
 accggggaatcatcaagacctctccaacggctgcgactacgtgtccaataagggcgtggaca
 ccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcaggagggcaagacctgtacgtga
 agggcgagcctatcatcaacttctacgacctctggtgtcccttccgacgagttcgacgct

ccatcagccaggtgaacgagaagatcaacgggaccctggccttcatccggaagtccgacgaga
 agctgcataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacg
 agatcgcccggatcaagaagctgatcggcgagccc

SEQ ID NO: 22

Аминокислотная последовательность PreF_NGTL_L112Q

MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVIT
 IELSNIKENKNGTDAKVLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGFLQGVGSAIASG
 IAVSKVLHLEGEVVKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSI
 SNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN
 VQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRG
 WYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPEVNLCNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVS
 SSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKS
 LYVKGPEIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINGTLAFIRKSDEKLNHVEDKIEEILSKIYH
 IENEIARIKKLIGEA

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный антиген респираторно-синцитиального вируса (PCB), содержащий полипептид F-белка PCB без трансмембранного домена, содержащий по меньшей мере часть полипептида F-белка PCB, соответствующую аминокислотам 26-105 эталонного предшественника полипептида F-белка (F₀) с последовательностью SEQ ID NO:2, и по меньшей мере часть полипептида F-белка PCB, соответствующую аминокислотам 137-516 эталонного предшественника полипептида F-белка (F₀) с последовательностью SEQ ID NO:2, где полипептид F-белка содержит по меньшей мере одну модификацию, которая изменяет гликозилирование, причем модификация включает замену одной или нескольких аминокислот, находящихся и/или расположенных рядом с аминокислотой в положении, соответствующем положению 500 последовательности SEQ ID NO:2, где рекомбинантный антиген RSV подходит для применения в вакцине.

2. Рекомбинантный антиген PCB по п.1, в котором модификация, изменяющая гликозилирование, включает замену одной или нескольких аминокислот, находящихся и/или расположенных рядом с аминокислотой в положении, соответствующем положению 500 последовательности SEQ ID NO:2.

3. Рекомбинантный антиген PCB по п.1 или 2, в котором аминокислоты, соответствующие положениям 500-502 последовательности SEQ ID NO:2, выбраны из NGS, NKS, NGT, NKT.

4. Рекомбинантный антиген PCB по любому из пп.1-3, в котором модификация, которая изменяет гликозилирование, включает замену глутамином аминокислоты, соответствующей аминокислоте в положении 500 последовательности SEQ ID NO:2.

5. Рекомбинантный антиген PCB по любому из пп.1-4, в котором полипептид F-белка содержит интактный слитый пептид между доменом F2 и доменом F1.

6. Рекомбинантный антиген PCB по любому из пп.1-5, в котором по меньшей мере одна модификация включает добавление аминокислотной последовательности, содержащей гетерологичный домен тримеризации.

7. Рекомбинантный антиген PCB по п.6, в котором гетерологичный домен тримеризации расположен на С-конце домена F1.

8. Рекомбинантный антиген PCB по любому из пп.1-7, содержащий домен F2 и домен F1 без сайта расщепления фурином между ними.

9. Рекомбинантный антиген PCB по любому из пп.1-8, в котором антиген PCB собирается в мультимер.

10. Рекомбинантный антиген PCB по любому из пп.1-9, в котором антиген PCB собирается в тример.

11. Рекомбинантный антиген PCB по любому из пп.1-10, в котором домен F2 содержит полипептид F-белка PCB, соответствующий аминокислотам 26-105, и/или в котором домен F1 содержит полипептид F-белка PCB, соответствующий аминокислотам 137-516 эталонного полипептида предшественника F-белка (F₀) последовательности SEQ ID NO:2.

12. Рекомбинантный антиген PCB по любому из пп.1-11, в котором антиген PCB выбран из группы, состоящей из:

- а) полипептида, содержащего последовательность SEQ ID NO:22;
- б) полипептида, кодируемого последовательностью SEQ ID NO:21 или полинуклеотидной последовательностью, которая гибридизуется в жестких условиях, по существу, по всей длине с последовательностью SEQ ID NO:21;
- в) полипептида, последовательность которого по меньшей мере на 95% идентична последователь-

ности SEQ ID NO:22.

13. Рекомбинантный антиген РСВ по любому из пп.1-12, в котором домен F2 содержит аминокислоты 1-105 полипептида F-белка РСВ.

14. Рекомбинантный антиген РСВ по любому из пп.1-13, в котором домен F2 и домен F1 расположены вместе с интактным слитым пептидом и не имеют промежуточного домена рер27.

15. Рекомбинантный антиген РСВ по любому из пп.1-14, в котором гетерологичный домен тримеризации содержит суперспирализованный домен.

16. Рекомбинантный антиген РСВ по п.15, в котором домен мультимеризации содержит изолейциновую молнию.

17. Рекомбинантный антиген РСВ по п.16, в котором домен изолейциновой молнии содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11.

18. Рекомбинантный антиген РСВ по любому из пп.1-17, в котором антиген РСВ содержит по меньшей мере одну замену или добавление гидрофильной аминокислоты в гидрофобном домене внеклеточного домена F-белка.

19. Рекомбинантный антиген РСВ по п.18, в котором гидрофобным доменом является суперспирализованный домен HRB внеклеточного домена F-белка.

20. Рекомбинантный антиген РСВ по п.19, в котором суперспирализованный домен HRB содержит замену на заряженный остаток вместо нейтрального остатка в положении, соответствующем аминокислоте 512 эталонного предшественника F-белка (F₀) последовательности SEQ ID NO:2.

21. Антиген РСВ по п.20, в котором суперспирализованный домен HRB содержит замену лейцина на лизин или глутамин в положении, соответствующем аминокислоте 512 эталонного предшественника F-белка (F₀) последовательности SEQ ID NO:2.

22. Рекомбинантный антиген РСВ по п.18, в котором гидрофобным доменом является домен HRA внеклеточного домена F-белка.

23. Рекомбинантный антиген РСВ по п.22, в котором домен HRA содержит добавление заряженного остатка после положения, соответствующего аминокислоте 105 эталонного предшественника F-белка (F₀) последовательности SEQ ID NO:2.

24. Рекомбинантный антиген РСВ по п.23, в котором домен HRA содержит добавление лизина после положения, соответствующего аминокислоте 105 эталонного предшественника F-белка (F₀) последовательности SEQ ID NO:2.

25. Рекомбинантный антиген РСВ по любому из пп.18-24, в котором антиген РСВ содержит, по меньшей мере, первую замену или добавление гидрофильной аминокислоты в домене HRA и, по меньшей мере, вторую замену или добавление гидрофильной аминокислоты в домене HRB внеклеточного домена F-белка.

26. Рекомбинантный антиген РСВ по любому из пп.1-25, в котором антиген РСВ содержит по меньшей мере одно добавление, делецию или замену аминокислоты, что исключает сайт расщепления фурином, присутствующий в природном предшественнике F-белка (F₀).

27. Рекомбинантный антиген РСВ по п.26, в котором антиген РСВ содержит добавление, делецию или замену аминокислоты, что исключает сайт расщепления фурином в положении, соответствующем аминокислотам 105-109, в положении, соответствующем аминокислотам 133-136, или в обоих положениях, соответствующих аминокислотам 105-109 и 133-136 эталонного предшественника F-белка (F₀) последовательности SEQ ID NO:2.

28. Рекомбинантный антиген РСВ по любому из пп.1-27, в котором полипептидные последовательности доменов F1 и F2 соответствуют штамму A Long РСВ.

29. Рекомбинантный антиген РСВ по любому из пп.1-28, в котором антиген РСВ содержит мультимер полипептидов.

30. Рекомбинантный антиген РСВ по любому из пп.1-28, в котором антиген РСВ содержит тример полипептидов.

31. Иммуногенная композиция, содержащая рекомбинантный антиген РСВ по любому из пп.1-30 и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

32. Иммуногенная композиция по п.31, дополнительно содержащая адьювант.

33. Иммуногенная композиция по п.32, в которой адьювант содержит по меньшей мере один из следующих: 3D-MPL, QS21, эмульсию типа масло-в-воде и квасцы.

34. Иммуногенная композиция по п.33, в которой адьювант содержит эмульсию типа масло-в-воде.

35. Иммуногенная композиция по п.33 или 34, в которой эмульсия типа масло-в-воде содержит токол.

36. Иммуногенная композиция по любому из пп.33-35, в которой эмульсия типа масло-в-воде содержит менее 5 мг сквалена на дозу для человека.

37. Иммуногенная композиция по любому из пп.32-36, в которой адьювант подходит для введения новорожденному.

38. Иммуногенная композиция по любому из пп.31-37, в которой если иммуногенная композиция содержит рекомбинантный антиген РСВ по любому из пп.1-30, то иммуногенная композиция дополни-

тельно содержит полипептид G-белка, содержащий аминокислотную последовательность, соответствующую положениям аминокислот 149-229 полипептида G-белка РСВ.

39. Иммуногенная композиция по любому из пп.31-38, дополнительно содержащая по меньшей мере один дополнительный антиген другого патогенного организма, отличного от РСВ.

40. Рекombинантная нуклеиновая кислота, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует рекombинантный антиген РСВ по любому из пп.1-30.

41. Рекombинантная нуклеиновая кислота по п.40, в которой полинуклеотидная последовательность, кодирующая антиген РСВ, оптимизирована по кодонам для экспрессии в выбранной клетке-хозяине.

42. Рекombинантная нуклеиновая кислота по п.40 или 41, в которой указанная полинуклеотидная последовательность выбрана из:

а) полинуклеотидной последовательности, содержащей последовательность SEQ ID NO:21;

б) полинуклеотидной последовательности, которая кодирует последовательность SEQ ID NO:22;

в) полинуклеотидной последовательности, которая гибридизуется в жестких условиях, по существу, на протяжении всей длины с последовательностью SEQ ID NO:21;

д) полинуклеотидной последовательности, последовательность которой по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO:21, где полинуклеотидная последовательность не соответствует природному штамму РСВ.

43. Вектор, содержащий рекombинантную нуклеиновую кислоту по любому из пп.40-42.

44. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.40 или 41 или вектор по п.43.

45. Применение антигена РСВ по любому из пп.1-30 для получения лекарственного средства для лечения РСВ-инфекции.

46. Применение по п.45, где лекарственное средство вводят для целей профилактики или лечения РСВ-инфекции.

47. Способ индукции иммунного ответа против респираторно-синцитиального вируса, включающий введение пациенту композиции, содержащей рекombинантный антиген РСВ по любому из пп.1-30, или иммуногенной композиции по любому из пп.31-39.

48. Способ по п.47, в котором введение композиции, содержащей антиген РСВ, вызывает иммунный ответ, специфичный для РСВ, не усиливая вирусное заболевание после контакта с РСВ.

49. Способ по п.47 или 48, в котором иммунный ответ включает защитный иммунный ответ, который ослабляет или предотвращает инфекцию РСВ и/или уменьшает или предотвращает патологический ответ после инфекции РСВ.

50. Способ по любому из пп.47-49, в котором пациентом является человек.

51. Способ получения рекombинантного антигена РСВ с измененной картиной гликозилирования, включающий

экспрессию нуклеиновой кислоты по любому из пп.40-42 в клетке-хозяине и

выделение экспрессированного при этом рекombинантного антигена РСВ.

52. Способ повышения экспрессии полипептида слитого белка РСВ, включающий экспрессию в клетке-хозяине нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид слитого белка РСВ, содержащий по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к добавлению, делеции или замене аминокислоты, где добавление, делеция или замена аминокислоты изменяет сайт гликозилирования кодируемого полипептида слитого белка РСВ по сравнению с природным слитым белком РСВ, при этом изменение сайта гликозилирования повышает экспрессию полипептида слитого белка РСВ по сравнению со слитым белком РСВ без добавления, делеции или замены аминокислоты.

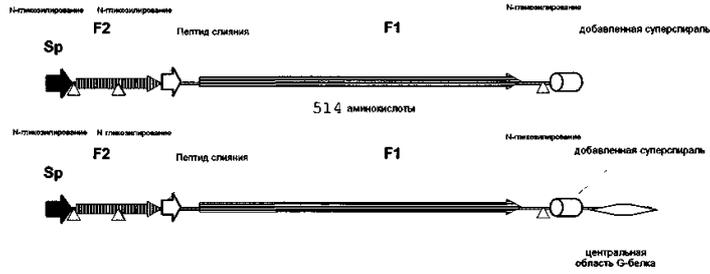
53. Способ по п.52, в котором нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид слитого белка РСВ, дополнительно содержит добавочную мутацию, которая приводит к добавлению, делеции или замене аминокислоты, которая исключает сайт расщепления пептидазой в кодируемом полипептиде слитого белка РСВ.

54. Способ по п.52 или 53, в котором полипептидом слитого белка РСВ является рекombинантный полипептид белка слияния, стабилизированный в конформации, имеющейся до слияния.

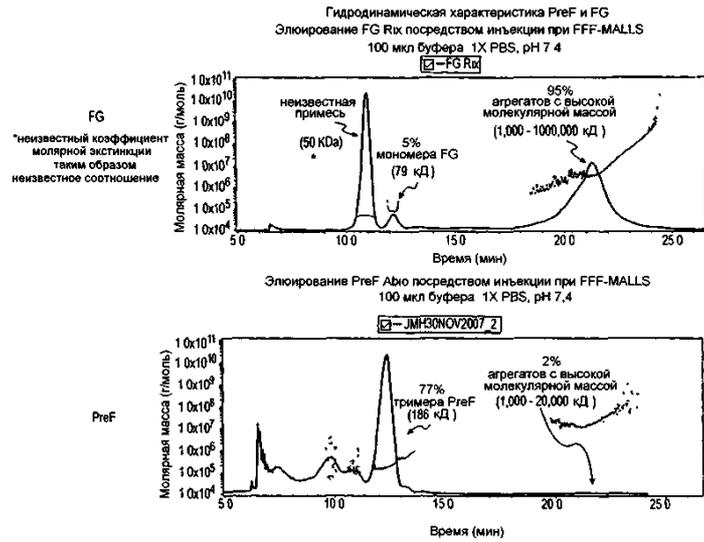


574 аминокислоты

Фиг. 1А



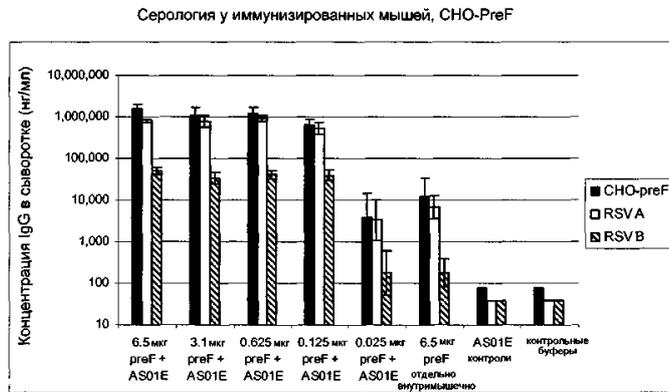
Фиг. 1B



Фиг. 2

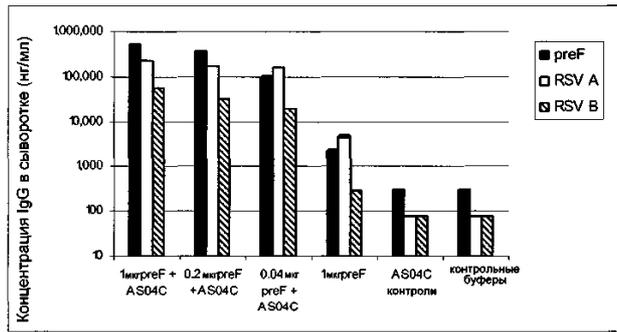


Фиг. 3



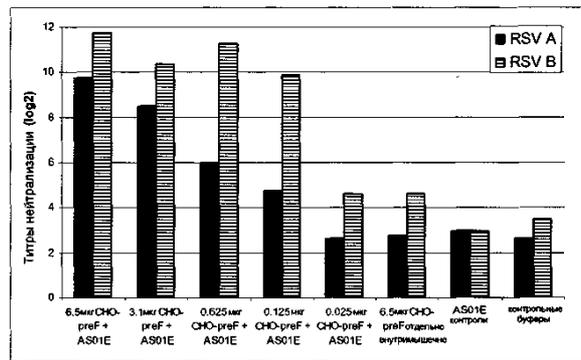
Фиг. 4A

Серология у иммунизированных мышей, CHO-PreF



Фиг. 4B

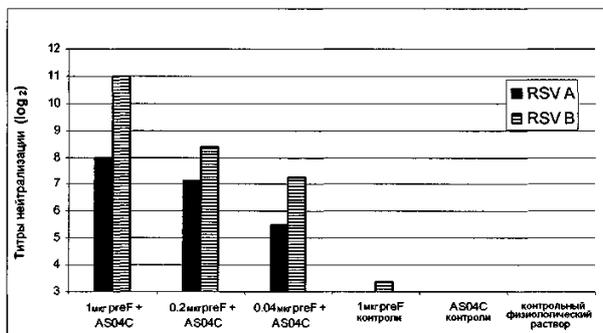
Оценка титров нейтрализации in vivo CHO-PreF



* такой же анализ, сыворотки взяты из другого исследования животных

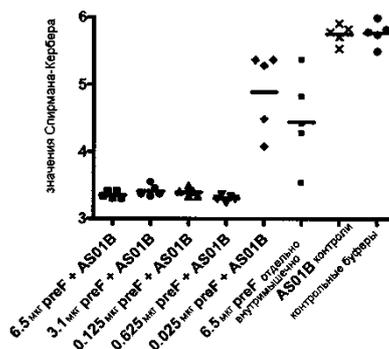
Фиг. 5A

Оценка титров нейтрализации in vivo CHO-PreF

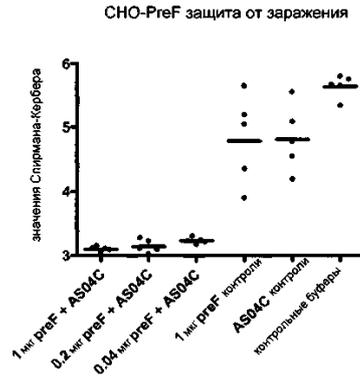


Фиг. 5B

CHO-PreF защита от заражения

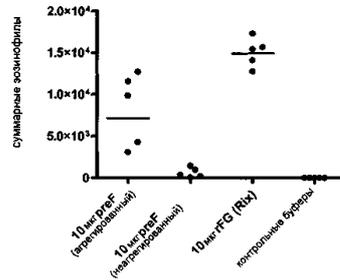


Фиг. 6A



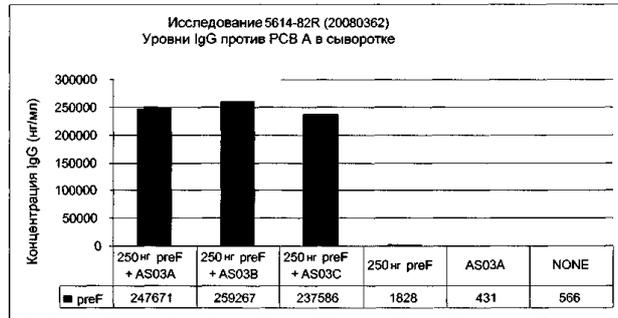
Фиг. 6В

Рекрутинг эозинофилов в легкие после заражения у мышей



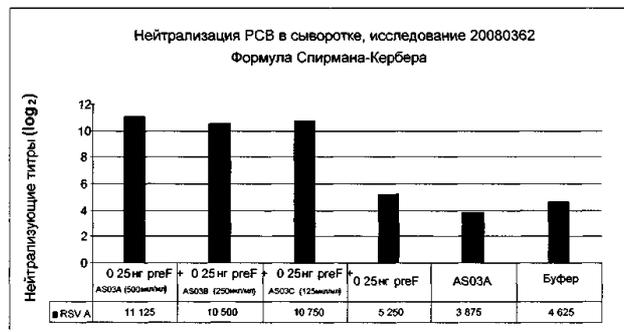
Фиг. 7

Уровни IgG в сыворотке у мышей, иммунизированных PreF, приготовленным с адьювантом в виде эмульсии типа «масло в воде»

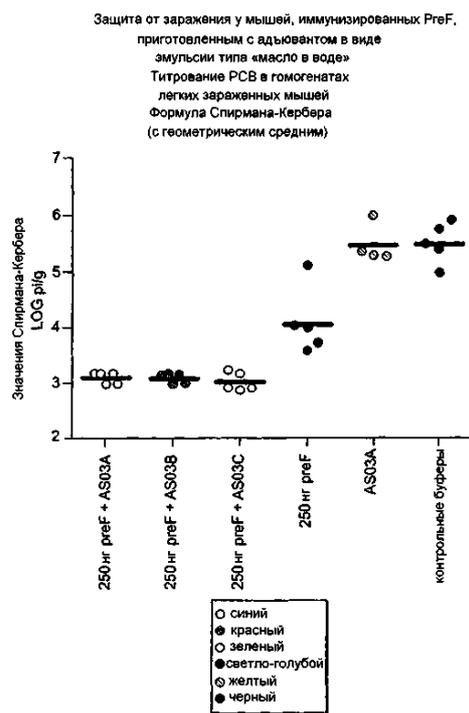


Фиг. 8

Титры нейтрализующих антител у мышей, иммунизированных PreF, приготовленным с адьювантом в виде эмульсии типа «масло в воде»



Фиг. 9



Фиг. 10

Список последовательностей

<110> GlaxoSmithKline Biologicals S.A.
 ID Biomedical Corporation of Quebec
 BAUDOUX, Guy J-M
 BLAIS, Normand
 Rheault, Patrick
 RUEILLE, Jean-Louis
 CYR, Sonya

<120> РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИГЕНЫ РСВ

<130> VU62788-1 PCT

<150> 61/219,964
 <151> 2009-06-24

<150> 61/334,568
 <151> 2010-05-13

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 1697
 <212> ДНК
 <213> респираторно-синцитиальный вирус

<400> 1
 atggagttgc taatcctcaa agcaaatgca attaccacaa tcctcactgc agtcacattt 60
 gttttgcttc tggcaaaaac atcactgaag aattttatca atcaacatgc agtgcagtag 120
 caaaggctat cttagtgctc tgagaactgg ttggtatacc agtggtataa ctatagatta 180
 agtaatatca aggaaaataa gtgtaatgga acagatgcta aggtaaaatt gataaacaag 240
 aattagataa atataaaaat gctgtaacag aattgcagtt gctcatgcaa agcaccacgc 300
 aacaaacaat cgagccagaa gagaactacc aaggtttatg aattatacac tcaaaatgcc 360
 aaaaaacca atgtaacatt aagcaagaaa aggaaaagaa gatttcttgg tttttgtag 420
 gtgttgatc tgcaatcgcc agtggcggtg ctgtatctaa ggtcctgcac ctgaagggga 480
 agtgaacaag atcaaaagtg ctctactatc cacaaacaag gctgtagtca gttatcaaat 540
 ggagttagtg tcttaaccag caaagtgtta gacctcaaaa actatataga aaacaattgt 600
 tacctattgt gaacaagcaa agctgcagca tatcaaatat agcaactgta tagagttcca 660
 acaaaagaac aacagactac tagagattac cagggaattt agtgtaagc aggtgtaact 720
 acacctgtaa gcacttacat gttaactaat agtgaattat tgtcattatc aatgatatgc 780
 ctataacaaa tgatcagaaa aagttaatgt ccaacaatgt tcaaatgtta gacagcaaaag 840
 ttactctatc atgtccataa taaaagagga agtcttagca tatgtgtaca attaccacta 900
 tatggtgtta tagatacacc ctggttgaaa ctacacacat cccctatgt acaaccaaca 960
 caaaagaag gtccaacatc tgtttaacaa gaactgacag aggtggtact gtgacaatgc 1020

023054

aggatcagta tctttcttcc cacaagctga aacatgtaaa gtcaatcaaa tcgagtattt 1080
 tgtgacacaa tgaacagttt aacattacca agtgaagtaa actctgcaat gttgacatat 1140
 tcaaccccaa atatgattgt aaaattatga cttcaaaaac gatgtaagca gtcctcgttat 1200
 cacactctcta ggagccattg tgtcatgcta tggcaaaaaca aatgtacagc atccaataaa 1260
 aatcgtggaa tcataaagac attttctaac gggcgcgata tgtatcaaat aaaggggtgg 1320
 aactgtgtc ttaggtaac acattatatt atgtaaaaag caagaaggta aaagtctcta 1380
 tghtaaaagg gaaccaataa taaatttcta tgacccttag tattcccctc tgatgaattt 1440
 gatgcatcaa tatctcaagt caacgagaag attaacagag cctagcattt atctgtaaat 1500
 ccgatgaatt attacataat gtaaagtctg gtaatccacc ataaatatca tgataactac 1560
 tataattata gtgattatag taatattggt atcttaattg ctgttgact gctcttatac 1620
 tgtaaggcca gaagcacacc agtcacacta agaaagatca actgagtggt ataaataata 1680
 ttgcatttag taactaa 1697

<210> 2
 <211> 574
 <212> БЕЛОК
 <213> респираторно-синцитиальный вирус
 <400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

023054

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

023054

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3
<211> 897
<212> ДНК
<213> респираторно-синцитиальный вирус

<400> 3
atgtccaaaa acaaggacca acgcaccgct aagacactag aaaagacctg ggacactctc 60
aatcatttat tattcatatc atcgggctta tataagttaa atcttaaadc tatagcacia 120
atcacattat ccattctggc aatgataatc tcaacttcac ttataattac agccatcata 180
ttcatagcct cggcaaacca caaagtcaca ctaacaactg caatcataca agatgcaaca 240
agccagatca agaacacaac cccaacatac ctcaactcagg atcctcagct tggaaatcagc 300

023054

ttctccaatc tgtctgaat tacatcaca accaccacca tactagcttc aacaacacca 360
 ggagtcaagt caaacctgca acccacaaca gtcaagacta aaaacacaac acaaccctaa 420
 acacaaccca gcaagcccac tacaanaaca cgcacaaaaca aaccaccaaa caaacccaat 480
 aatgattttc acttogaagt gtttaacttt gtaccctgca gcatatgcag caacaatcca 540
 acctgctggg ctatctgcaa aagaatacca aacaaaaaac caggaaagaa aaccaccacc 600
 aagcctacaa aaaaaccaac cttcaagaca accaaaaaag atctcaaac tcaaaccact 660
 aaaccaaagg aagtaccac caccaagccc acagaagagc caaccatcaa caccaccaa 720
 acaaacatca caactacact gctcaccaac aacaccacag gaaatccaaa actcacaagt 780
 caaatgaaa ccttccactc aacctctctc gaaggcaatc taagcccttc tcaagtctcc 840
 acaacatccg agcaccatc acaacctca tctccacca acacaacacg ccagtag 897

<210> 4
 <211> 298
 <212> БЕЛОК
 <213> респираторно-синцитиальный вирус
 <400> 4

Met Ser Lys Asn Lys Asp Gln Arg Thr Ala Lys Thr Leu Glu Lys Thr
 1 5 10 15
 Trp Asp Thr Leu Asn His Leu Leu Phe Ile Ser Ser Gly Leu Tyr Lys
 20 25 30
 Leu Asn Leu Lys Ser Ile Ala Gln Ile Thr Leu Ser Ile Leu Ala Met
 35 40 45
 Ile Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ile Thr Ala Ile Ile Phe Ile Ala Ser
 50 55 60
 Ala Asn His Lys Val Thr Leu Thr Thr Ala Ile Ile Gln Asp Ala Thr
 65 70 75 80
 Ser Gln Ile Lys Asn Thr Thr Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Asp Pro Gln
 85 90 95
 Leu Gly Ile Ser Phe Ser Asn Leu Ser Glu Ile Thr Ser Gln Thr Thr
 100 105 110
 Thr Ile Leu Ala Ser Thr Thr Pro Gly Val Lys Ser Asn Leu Gln Pro
 115 120 125
 Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser
 130 135 140

023054

Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn
145 150 155 160

Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys
165 170 175

Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys
180 185 190

Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe
195 200 205

Lys Thr Thr Lys Lys Asp Leu Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu
210 215 220

Val Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys
225 230 235 240

Thr Asn Ile Thr Thr Thr Leu Leu Thr Asn Asn Thr Thr Gly Asn Pro
245 250 255

Lys Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr Phe His Ser Thr Ser Ser Glu Gly
260 265 270

Asn Leu Ser Pro Ser Gln Val Ser Thr Thr Ser Glu His Pro Ser Gln
275 280 285

Pro Ser Ser Pro Pro Asn Thr Thr Arg Gln
290 295

<210> 5
<211> 1566
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Рекомбинантный полинуклеотид PreF

<400> 5
aagcttgcca ccatggagct gctgatcctg aaaaccaacg ccatcaccgc catcctggcc 60
gccgtgacct tgtgcttcgc ctccctccag aacatcaccg aggagttcta ccagtcacc 120
tgctccgccc tgtccaaggg ctacctgtcc gccctgcgga ccggctggta cacctccgtg 180
atcaccatcg agctgtccaa catcaaggaa aacaagtgca acggcaccga cgccaaggtg 240
aagctgatca agcaggagct ggacaagtac aagagcgccg tgaccgaact ccagctgctg 300
atgcagtcca cccctgccac caacaacaag tttctgggct tccctgctggg cgtgggctcc 360
gccatcgctt ccggcatcgc cgtgagcaag gtgctgcacc tggagggcga ggtgaacaag 420
atcaagagcg cctgctgtc caccaacaag gccgtggtgt cctgtccaa cggcgtgtcc 480

023054

gtgctgacct ccaaggtgct ggatctgaag aactacatcg acaagcagct gctgectatc 540
 gtgaacaagc agtcctgctc catctccaac atcgagaccg tgatecgagtt ccagcagaag 600
 aacaaccggc tgctggagat caccocgag ttctcctgta acgcccggct gaccaccctt 660
 gtgtccacct acatgctgac caactccgag ctgctgtccc tgatecaacga catgectatc 720
 accaacgacc agaaaaaact gatgtccaac aacgtgcaga tcgtgcgcca gcagtcctac 780
 agcatcatga gcatcatcaa ggaagaggtg ctggcctacg tgggtcagct gcctctgtac 840
 ggcgtgacg acaccccttg ctggaagctg cacacctccc cctgtgacac caccaacacc 900
 aaggagggtc ccaacatctg cctgaccgg accgaccggg gctggtactg cgacaacgcc 960
 ggctccgtgt cctttctccc tctggccgag acctgcaagg tgcagtccaa ccgggtgttc 1020
 tgcgacacca tgaactcctt gaccctgctt tccgaggtga acctgtgcaa catcgacatc 1080
 ttcaaccccc agtacgactg caagatcatg accagcaaga ccgacgtgtc ctccagegtg 1140
 atcacctccc tgggcccatt cgtgtcctgc tacggcaaga ccaagtgcac cgcctccaac 1200
 aagaaccggg gaatcatcaa gaccttctcc aacggctgct actacgtgtc caataagggc 1260
 gtggacaccg tgtccgtggg caacacactg tactacgtga ataagcagga gggcaagagc 1320
 ctgtacgtga agggcgagcc tatcatcaac ttctacgacc ctctgggtgt cccttccgac 1380
 gaggctcagc cctccatcag ccaggtgaac gagaagatca accagtcctt ggccttcac 1440
 cggaggtccg acgagaagct gcataacgtg gaggacaaga tcgaggagat cctgtccaaa 1500
 atctaccaca tcgagaacga gatcgcccgg atcaagaagc tgatecggcga ggcctgataa 1560
 tctaga 1566

<210> 6
 <211> 514
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Рекомбинантный антиген PreF

<400> 6

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

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

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

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

023054

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

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

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Phe Leu Gly Phe Leu Leu
 100 105 110

Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu
 115 120 125

His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr
 130 135 140

Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser
 145 150 155 160

Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile
 165 170 175

Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu
 180 185 190

Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser
 195 200 205

Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn
 210 215 220

Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln
 225 230 235 240

Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr
 245 250 255

Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln
 260 265 270

Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr
 275 280 285

Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu
 290 295 300

Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser
 305 310 315 320

023054

Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe
 325 330 335
 Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys
 340 345 350
 Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser
 355 360 365
 Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val
 370 375 380
 Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly
 385 390 395 400
 Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly
 405 410 415
 Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln
 420 425 430
 Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr
 435 440 445
 Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln
 450 455 460
 Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp
 465 470 475 480
 Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys
 485 490 495
 Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly
 500 505 510

Glu Ala

<210> 7

<211> 1855

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полинуклеотидная последовательность химерного антигена PreF-G

<400> 7

aagcttgcca ccatggagct gctgacctc aagaccaacg ccatcaccgc catcctggcc

60

023054

gcccgtgacc tgtgcttcgc ctctcccag aacatcaccg aagagttcta ccagtccacc 120
tgcctccgcg tgtccaaggg ctacctgtcc gcctcgcgga ccggctggta cacctccgtg 180
atcaccatcg agctgtccaa catcaaagaa aacaagtga acggcaccga cgccaaggtc 240
aagctgatca agcaggaact ggacaagtac aagagcgccg tgaccgaact ccagctgctg 300
atgcagtcca cccctgccac caacaacaag aagtttctgg gcttctctgt gggcgtgggc 360
tccgccatcg cctccggcat cgccgtgagc aaggtgctgc acctggaggg cgaggatgaac 420
aagatcaaga gcgcctctgt gtccaccaac aaggccgtgg tgcctctgtc caaccgctg 480
tccgtgtgca cctccaaggc gctggatctg aagaactaca tcgacaagca gctgctgctt 540
atcgtgaaca agcagtcctg ctccatctcc aacatcgaga ccgtgatcga gttccagcag 600
aagaacaacc ggctgctgga gatcaccgcc gagttctccg tgaacgccgg cgtgaccacc 660
cctgtgtcca cctacatgct gacaaactcc gagctgctct cctgatcaa cgacatgctt 720
atcaccaacg accaaaaaaaa gctgatgtcc aacaacgtgc agatcgtgcg gcagcagtc 780
tacagcatca tgagcatcat caaggaagaa gtccctggcct acgtcgtgca gctgcctctg 840
tacggcgtga tcgacacccc ttgctggaag ctgcacacct cccccctgtg caccaccaac 900
accaaaagg gctccaacat ctgctgacc cggaccgacc ggggctggta ctgcgacaac 960
gcccgtccg tgtccttctt ccctctggcc gagacctgca aggtgcagtc caaccgggtg 1020
ttctcgaca ccatgaactc cctgacctg ccttccgagg tgaacctgtg caacatcgac 1080
atcttcaacc ccaagtacga ctgcaagatc atgaccagca agaccgacgt gtccctcagc 1140
gtgatcacct ccctgggcgc catcgtgtcc tgctacggca agaccaagtg caccgcctcc 1200
aacaagaacc ggggaatcat caagacctc tccaacggct gcgactacgt gtccaataag 1260
ggcgtggaca ccgtgtccgt gggcaacaca ctgtactacg tgaataagca ggaaggcaag 1320
agcctgtacg tgaaggcgga gcctatcctc aacttctacg accctctggt gttcccttcc 1380
gacgagttcg acgcctccat cagccaggtc aacgagaaga tcaaccagtc cctggccttc 1440
atccggaagt ccgacgagaa gctgcataac gtggaggaca agatcgaaga gatcctgtcc 1500
aaaatctacc acatcgagaa cgagatgcgc cggatcaaga agctgatcgg cgaggctggc 1560
ggctctggcg gcagcggcgg ctccaagcag cggcagaaca agcctcctaa caagcccaac 1620
aacgacttcc acttcgaggc gttcaacttc gtgccttctc ccactctgtc caacaacct 1680
acctgctggg ccatctgcaa gagaatcccc aacaagaagc ctggcaagaa aaccaccacc 1740
aagcctacca agaagcctac cttcaagacc accaagaagg accacaagcc tcagaccaca 1800
aagcctaagg aagtccaac caccaagcac caccaccatc accactgata atcta 1855

<210> 8

<211> 605

023054

<212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Химерный полипептид PreF-G

 <400> 8

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

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

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

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

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

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

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Lys Phe Leu Gly Phe Leu
 100 105 110

Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val
 115 120 125

Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser
 130 135 140

Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr
 145 150 155 160

Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro
 165 170 175

Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile
 180 185 190

Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe
 195 200 205

Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr
 210 215 220

023054

Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp
 225 230 235 240

Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser
 245 250 255

Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val
 260 265 270

Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His
 275 280 285

Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys
 290 295 300

Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val
 305 310 315 320

Ser Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val
 325 330 335

Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu
 340 345 350

Cys Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr
 355 360 365

Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile
 370 375 380

Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg
 385 390 395 400

Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys
 405 410 415

Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys
 420 425 430

Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe
 435 440 445

Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser
 450 455 460

Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser
 465 470 475 480

023054

Asp Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser
 485 490 495

Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile
 500 505 510

Gly Glu Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Lys Gln Arg Gln
 515 520 525

Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe
 530 535 540

Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala
 545 550 555 560

Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr
 565 570 575

Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys Thr Thr Lys Lys Asp His Lys
 580 585 590

Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val Pro Thr Thr Lys
 595 600 605

<210> 9
 <211> 1834
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Уимерный полинуклеотид PreF-G

<400> 9
 aagcttgcca ccatggagct gctgacecte aagaccaacg ccatcaccgc catcctggcc 60
 gccgtgacct tgtgcttcgc ctctcccag aacatcaccg aagagttcta ccagtccacc 120
 tgctccgccg tgtccaaggg ctacctgtcc gccctgcgga ccgctggta cacctccgtg 180
 atcaccatcg agctgtccaa catcaaagaa aacaagtga acggcaccga cgccaaggtc 240
 aagctgatca agcaggaact ggacaagtac aagagcgccg tgaccogaact ccagctgctg 300
 atgcagtcca cccctgccac caacaacaag aagtttctgg gcttcctgct gggcgtgggc 360
 tccgccatcg cctccggcat cgccgtgagc aaggtgctgc acctggaggg cgaggtgaac 420
 aagatcaaga ggcacctgct gtccaccaac aaggccgtgg tgcacctgtc caacggcgtg 480
 tccgtgctga cctccaaggc gctggatctg aagaactaca tcgacaagca gctgctgctc 540
 atcgtgaaca agcagtcctg ctccatctcc aacatcgaga ccgtgatcga gttccagcag 600
 aagaacaacc ggctgctgga gatcaccgcg gagttctccg tgaacgcccg cgtgaccacc 660
 cctgtgtcca cctacatgct gacaaaactcc gagctgctct cctgatcaa cgacatgctc 720

```

atcaccaacg accaaaaaaa gctgatgtcc aacaacgtgc agatcgtgcg gcagcagtc 780
tacagcatca tgagcatcat caaggaagaa gtccctggcct acgctcgtgca gctgcctctg 840
tacggcgtga tcgacacccc ttgctggaag ctgcacacct ccccccctgtg caccaccaac 900
accaaagagg gctccaacat ctgcctgacc cggaccgacc ggggctggta ctgcgacaac 960
gccggctccg tgtccttctt ccctctggcc gagacctgca aggtgcagtc caaccgggtg 1020
ttctcgaca ccatgaactc cctgaccctg ccttccgagg tgaacctgtg caacatcgac 1080
atcttcaacc ccaagtacga ctgcaagatc atgaccagca agaccgacgt gctctccagc 1140
gtgatcacct ccctgggccc catcgtgtcc tgctacggca agaccaagtg caccgcctcc 1200
aacaagaacc ggggaatcat caagacctc tccaacggct gcgactacgt gtccaataag 1260
ggcgtggaca ccgtgtccgt gggcaacaca ctgtactacg tgaataagca ggaaggcaag 1320
agcctgtaag tgaagggcga gcctatcacc aacttctacg accctctggt gttcccttcc 1380
gacgagtccg acgctccat cagccaggtc aacgagaaga tcaaccagtc cctggccttc 1440
atccggaagt ccgacgagaa gctgcataac gtggaggaca agatcgaaga gatcctgtcc 1500
aaaatctacc acatcgagaa cgagatgcc cggatcaaga agctgatcgg cgaggctggc 1560
ggcaagcagc ggcagaacaa gcctcctaac aagcccaaca acgacttcca ctcgagggtg 1620
ttcaacttgg tgccttgctc catctgtccc aacaacccta cctgctgggc catctgcaag 1680
agaatcccc acaagaagcc tggcaagaaa accaccacca agcctaccaa gaagcctacc 1740
ttcaagacca ccaagaagga ccacaagcct cagaccacaa agcctaagga agtgccaacc 1800
accaaagcacc accaccatca ccaactgataa tcta 1834

```

```

<210> 10
<211> 598
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> Химерный полипептид PreF-G

```

```

<400> 10

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

023054

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

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

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Lys Phe Leu Gly Phe Leu
 100 105 110

Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val
 115 120 125

Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser
 130 135 140

Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr
 145 150 155 160

Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro
 165 170 175

Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile
 180 185 190

Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe
 195 200 205

Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr
 210 215 220

Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp
 225 230 235 240

Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser
 245 250 255

Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val
 260 265 270

Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His
 275 280 285

Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys
 290 295 300

Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val
 305 310 315 320

023054

Ser Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val
 325 330 335

Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu
 340 345 350

Cys Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr
 355 360 365

Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile
 370 375 380

Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg
 385 390 395 400

Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys
 405 410 415

Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys
 420 425 430

Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe
 435 440 445

Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser
 450 455 460

Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser
 465 470 475 480

Asp Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser
 485 490 495

Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile
 500 505 510

Gly Glu Ala Gly Gly Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro
 515 520 525

Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile
 530 535 540

Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn
 545 550 555 560

Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr
 565 570 575

Phe Lys Thr Thr Lys Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys
 580 585 590

Glu Val Pro Thr Thr Lys
 595

<210> 11
 <211> 28
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Замещенная изолейцином лейциновая молния GCN4

<400> 11

Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn
 1 5 10 15

Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ala
 20 25

<210> 12
 <211> 1563
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Оптимизированная по кодонам нуклеотидная последовательность PreF

<400> 12
 atggagctgc ccacccctgaa gaccsaacgcc atcaccacca tcctcgccgc cgtgaccctg 60
 tgcttcgccca gcagccagaa catcacggag gagttctacc agagcacgtg cagcgccgtg 120
 agcaagggtt acctgagcgc gctgcgcacg ggctggtaca cgagcgtgat cacgatcgag 180
 ctgagcaaca tcaaggagaa caagtgaac ggcacggacg cgaaggtgaa gctgatcaag 240
 caggagctgg acaagtacaa gagcgcggtg acggagctgc agctgctgat gcagagcacg 300
 ccggcgacga acaacaagtt cctcggcttc ctgctgggcg tgggcagcgc gatcgcgagc 360
 ggcacgcgcc tgagcaaggt gctgcacctg gagggcggag tgaacaagat caagtccgcg 420
 ctgctgagca cgaacaaggc ggtcgtgagc ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgacgagc 480
 aaggtgctcg acctgaagaa ctacatcgac aagcagctgc tgccgatcgt gaacaagcag 540
 agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg atcgagttcc agcagaagaa caaccgcctg 600
 ctggagatca cgcgggagtt ctccgtgaac gcaggcgtga cgacgcccgt gtctacgtac 660
 atgctgacga acagcgagct gctcagcctg atcaacgaca tgccgatcac gaacgaccag 720
 aagaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc gtgcgccagc agagctacag catcatgagc 780
 atcatcaagg aggaggtgct gccatcagtg gtgcagctgc cgctgtacgg cgtcacgac 840

023054

```

acgccctgct ggaagctgca cagagcccc ctgtgcacga ccaacacgaa ggagggcagc 900
aacatctgcc tgacgcggac ggaccggggc tggtactgog acaacgcggg cagcgtgagc 960
ttcttccccg cgcgggagac gtgcaagggtg cagagcaacc gcgtcttctg cgacacgatg 1020
aacagcctga cgtgtcccgag cagagtgaa cctgtgcaaca tcgacatctt caaccggaag 1080
tacgactgca agatcatgac gagcaagacc gatgtcagca gcagcgtgat cagcagcctc 1140
ggcgcgatcg tgagctgcta cggcaagacg aagtgcacgg cgagcaacaa gaaccgcggc 1200
atcatcaaga cgttcagcaa cggctgggac tatgtgagca acaaggggct ggacactgtg 1260
agcgtcggca acacgctgta ctacgtgaac aagcaggagg gcaagagcct gtacgtgaag 1320
ggcgagccga tcatcaactt ctacgaccgc ctctgttcc cgagcgacga gttcgcgcg 1380
agcatcagcc aagtgaacga gaagatcaac cagagcctgg cgttcatccg caagagcgac 1440
gagaagctgc acaacgtgga ggacaagatc gaggagatcc tgagcaagat ctaccacatc 1500
gagaacgaga tcgcgcgcat caagaagctg atcggcgagg cgcacatca ccatcaccat 1560
tga 1563

```

<210> 13

<211> 1685

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полинуклеотидная последовательность PreF с интроном

<400> 13

```

atggagctgc tgatcctgaa aaccaacgcc atcacgcgca tctctggcgc cgtgaccctg 60
tgcttcgct cctcccagaa catcaccgag gagttctacc agtccacctg ctccgcgctg 120
tccaagggt acctgtccgc cctgcggacc ggctggtaca cctccgtgat caccatcgag 180
ctgtccaaca tcaaggaaaa caagtgcaac ggcaccgacg ccaaggtgaa gctgatcaag 240
caggagctgg acaagtacaa gagcgcctg accgaactcc agctgctgat gcagtccacc 300
cctgccacca acaacaagtt tctgggcttc ctgctgggcg tgggctccgc cctcgcctcc 360
ggcatcgccg tgagcaaggt acgtgtcggg acttgtgttc ccctttttt aataaaaagt 420
tatacttta atggtatata catatttct gtatgtgatc catgtgctta tgactttggt 480
tatcatgtgt ttaggtgctg caccctggagg gcgaggtgaa caagatcaag agcgcctctg 540
tgtccacca caaggcctg gtgtccctgt ccaacggcgt gtcctgctg acctccaagg 600
tgctggatct gaagaactac atcgacaagc agctgctgcc tategtgaa aagcagtcct 660
gctccatctc caacatcgag accgtgatcg agttccagca gaagaacaac cggctgctgg 720
agatcacccc cgagttctcc gtgaacgcgc gcgtgaccac cctgtgtcc acctacatgc 780
tgaccaactc cgagctgctg tcctgatca acgacatgcc tataccaac gaccagaaaa 840

```

aactgatgtc caacaacgtg cagatcgtgc ggcagcagtc ctacagcadc atgagcatca 900
tcaaggaaga ggtgctggcc tacgtggtgc agctgcctct gtacggcgtg atcgacaccc 960
cttgctggaa gctgcacacc tccccctgt gcaccaccaa caccaaggag ggctccaaca 1020
tctgctgac ccggaccgac cggggctggt actgagacaa cgcggctcc gtgtccttct 1080
tccctctggc cgagacctgc aaggtgcagt ccaaccgggt gttctcgcac accatgaact 1140
ccctgacctt gccttccgag gtgaacctgt gcaacatcga catcttcaac cccaagtagc 1200
actgcaagat catgaccagc aagaccgacg tgtcctccag cgtgatcacc tccctggggc 1260
ccatcgtgtc ctgctacggc aagaccaagt gcaccgcctc caacaagaac cggggaatca 1320
tcaagacctt ctccaacggc tgcgactacg tgtccaataa gggcgtggac accgtgtccg 1380
tgggcaacac actgtactac gtgaataagc aggagggcaa gagcctgtac gtgaagggcg 1440
agcctatcat caacttctac gaccctctgg tgttcccttc cgcagagttc gacgcctcca 1500
tcagccaggt gaacgagaag atcaaccagt ccctggcctt catccggaag tccgacgaga 1560
agctgcataa cgtggaggac aagatcgagg agatcctgtc caaaatctac cacatcgaga 1620
acgagatcgc ccgatcaag aagctgatcg gcgaggccgg aggtcaccac caccatcacc 1680
actga 1685

<210> 14
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептидный линкер

<400> 14

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 15
<211> 4
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Консенсусный мотив расщепления фурином

<400> 15

Arg Ala Arg Arg
1

<210> 16
<211> 4
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Консенсусный мотив расщепления фурином

<400> 16

Arg Lys Arg Arg
 1

<210> 17
 <211> 1542
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полинуклеотид PreF

<400> 17

atggagctgc tgatcctgaa aaccaacgcc atcaccccca tcctggccgc cgtgaccctg	60
tgcttcgcct cctcccagaa caccaccgag gagttctacc agtccacctg ctccgccctg	120
tccaagggct acctgtccgc cctgcggacc ggctggtaca cctccgtgat caccatcgag	180
ctgtccaaca tcaaggaaa caagtgaac ggcaccgacg ccaaggtgaa gctgatcaag	240
caggagctgg acaagtacaa gagcgccgtg accgaactcc agctgctgat gcagtccacc	300
cctgccacca acaacaagtt tctgggcttc ctgctggcgg tgggctccgc catcgctcc	360
ggcatcgccg tgagcaaggt gctgcacctg gaggcgagg tgaacaagat caagagcgcc	420
ctgctgtcca ccaacaaggc cgtgggtgct ctgtccaacg gcgtgtccgt gctgacctcc	480
aaggtgctgg atctgaagaa ctacatcgac aagcagctgc tgcctatcgt gaacaagcag	540
tcctgtcca tctccaacat cgagaccgtg atcgagtcc agcagaagaa caaccggtg	600
ctggagatca ccccgagtt ctccgtgaac gccggcgtga ccacccctgt gtccacctac	660
atgctgacca actccgagct gctgtccctg atcaacgaca tgcctatcac caacgaccag	720
aaaaaactga tgtccaacaa cgtgcagatc gtgcggcagc agtccctacag catcatgagc	780
atcatcaagg aagaggtgct ggcctacgtg gtgcagctgc ctctgtacgg cgtgatcgac	840
acccttgct ggaagctgca cacctcccc ctgtgcacca ccaacaccaa ggagggtcc	900
aacatctgcc tgaccgggac cgaccggggc tggactgcg acaacgccgg ctccgtgtcc	960
ttcttccctc tggccgagac ctgcaagggt cagtccaacc ggggtttctg cgacaccatg	1020
aactccctga cctgccttc cgagggtgaa ctgtgcaaca tcgacatctt caacccaag	1080
taagactgca agatcatgac cagcaagacc gacgtgtcct ccagcgtgat cacctccctg	1140
gggccatcg tgtcctgcta cggcaagacc aagtgcaccg cctccaacaa gaaccgggga	1200
atcatcaaga ctttctccaa cggctgcgac tacgtgtcca ataagggcgt ggacaccgtg	1260
tccgtgggca acacactgta ctacgtgaat aagcaggagg gcaagagcct gtacgtgaag	1320
ggcgagccta tcatcaactt ctacgacct ctggtgttcc cttccgacga gttcgacgcc	1380

023054

tccatcagcc aggtgaacga gaagatcaac gggaccctgg ccttcacccg gaagtccgac 1440
 gagaagctgc ataacgtgga ggacaagatc gaggagatcc tgcctcaaat ctaccacatc 1500
 gagaacgaga tcgccccgat caagaagctg atcggcgagg cc 1542

<210> 18
 <211> 514
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полипептид PreF

<400> 18

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

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

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

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

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

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

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Phe Leu Gly Phe Leu Leu
 100 105 110

Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu
 115 120 125

His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr
 130 135 140

Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser
 145 150 155 160

Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile
 165 170 175

Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu
 180 185 190

023054

Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser
 195 200 205

Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn
 210 215 220

Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln
 225 230 235 240

Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr
 245 250 255

Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln
 260 265 270

Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr
 275 280 285

Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu
 290 295 300

Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser
 305 310 315 320

Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe
 325 330 335

Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys
 340 345 350

Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser
 355 360 365

Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val
 370 375 380

Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly
 385 390 395 400

Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly
 405 410 415

Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln
 420 425 430

Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr
 435 440 445

023054

Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln
 450 455 460

Val Asn Glu Lys Ile Asn Gly Thr Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp
 465 470 475 480

Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys
 485 490 495

Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly
 500 505 510

Glu Ala

<210> 19
 <211> 1542
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полинуклеотид PreF

<400> 19
 atggagctgc tgatcctgaa aaccaacgcc atcaccgccca tcttgcccgc cgtgaccctg 60
 tgcttcgcct cctcccagaa catcaccgag gaggttctacc agtccacctg ctcccgcctg 120
 tccaagggct acctgtccgc cctgcccacc ggctggtaca cctccgtgat caccatcgag 180
 ctgtccaaca tcaaggaaaa caagtgcaac ggcaccgacg ccaaggtgaa gctgatcaag 240
 caggagctgg acaagtacaa gagcgcctg accgaactcc agctgctgat gcagtcacc 300
 cctgccacca acaacaagtt tctgggcttc ctgcaggggc tgggctccgc catcgcctcc 360
 ggcatcgccg tgagcaaggt gctgcacctg gagggcgagg tgaacaagat caagagcgcc 420
 ctgtgttcca ccaacaaggc cgtggtgtcc ctgtccaacg gcgtgtccgt gctgacctcc 480
 aaggtgctgg atctgaagaa ctacategac aagcagctgc tgccatcgt gaacaagcag 540
 tctctctcca tctccaacat cgagaccgtg atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg 600
 ctggagatca cccgcgagtt ctccgtgaac gccggcgtga ccaccctgt gtccacctac 660
 atgctgacca actccgagct gctgtccctg atcaacgaca tgccatcac caacgaccag 720
 aaaaaactga tgtccaacaa cgtgcagatc gtgcggcagc agtcctacag catcatgagc 780
 atcatcaagg aagaggtgct ggctacgtg gtgcagctgc ctctgtacgg cgtgatcgac 840
 accccttgct ggaagetgca cacctcccc ctgtgcacca ccaacaccaa ggagggtccc 900
 aacatctgcc tgaccgggac cgaccggggc tggactgctg acaacgccgg ctccgtgtcc 960
 ttcttccctc tggccgagac ctgcaaggct cagtccaacc ggggtttctg cgacaccatg 1020

023054

```

aactcctga cctgccttc cgaggtgaac ctgtgcaaca tcgacatctt caacccaag 1080
tacgactgca agatcatgac cagcaagacc gacgtgtcct ccagcgtgat cacctcctg 1140
ggcgccatcg tgtcctgcta cggcaagacc aagtgcaccg cctccaacaa gaaccgggga 1200
atcatcaaga ccttctccaa cggctgcgac tacgtgtcca ataagggcgt ggacaccgtg 1260
tccgtgggca acacactgta ctacgtgaat aagcaggagg gcaagagcct gtacgtgaag 1320
ggcgagccta tcatcaactt ctacgacctt ctgggtgtcc cttccgacga gttcgaagcc 1380
tccatcagcc aggtgaacga gaagatcaac cagtcctcgg ccttcacocg gaagtccgac 1440
gagaagctgc ataactgtga ggacaagatc gaggagatcc tgtccaaaat ctaccacatc 1500
gagaacgaga tcgccccgat caagaagctg atcggcgagg cc 1542

```

```

<210> 20
<211> 514
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> Синтетический полипептид PreF

```

```

<400> 20

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Phe Leu Gly Phe Leu Gln
100          105          110

```

```

Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu
115          120          125

```

```

His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr
130          135          140

```

023054

Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser
 145 150 155 160

Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile
 165 170 175

Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu
 180 185 190

Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser
 195 200 205

Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn
 210 215 220

Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln
 225 230 235 240

Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr
 245 250 255

Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln
 260 265 270

Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr
 275 280 285

Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu
 290 295 300

Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser
 305 310 315 320

Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe
 325 330 335

Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys
 340 345 350

Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser
 355 360 365

Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val
 370 375 380

Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly
 385 390 395 400

023054

Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly
 405 410 415

Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln
 420 425 430

Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr
 435 440 445

Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln
 450 455 460

Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp
 465 470 475 480

Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys
 485 490 495

Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly
 500 505 510

Glu Ala

<210> 21
 <211> 1542
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полинуклеотид PreF

<400> 21
 atggagctgc tgatcctgaa aaccaacgcc atcaccgcca tcctggccgc cgtgacctg 60
 tgcttcgcct cctcccagaa catcaccgag gaggttctacc agtccacctg ctccgcctg 120
 tccaagggct acctgtccgc cctgcccacc ggctggtaca cctccgtgat caccatcgag 180
 ctgtccaaca tcaaggaaaa caagtgcaac ggcaccgacg ccaagggtgaa gctgatcaag 240
 caggagctgg acaagtacaa gagcgccgtg accgaactcc agctgctgat gcagtcacc 300
 cctgccacca acaacaagtt tctgggcttc ctgcaggggc tgggtccgc catcgctcc 360
 ggcacgcgcc tgagcaaggt gctgcacctg gagggcgagg tgaacaagat caagagcgcc 420
 ctgctgtcca ccaacaaggc cgtggtgtcc ctgtccaacg gcgtgtccgt gctgacctcc 480
 aagggtgctg atctgaagaa ctacatcgac aagcagctgc tgctatcgt gaacaagcag 540
 tctgctcca tctccaacat cgagaccgtg atcgagttcc agcagaagaa caaccggctg 600
 ctggagatca cccgcgagtt ctccgtgaac gccggcgtga ccaccctgt gtccacctac 660

```

atgctgacca actccgaget gctgtccctg atcaacgaca tgctatcac caacgaccag      720
aaaaaactga tgtccaacaa cgtgcagatc gtgcggcagc agtcctacag catcatgagc      780
atcatcaagg aagaggtgct ggctacgtg gtgcagctgc ctctgtacgg cgtgatcgac      840
acccttgct ggaagtgca cacctcccc ctgtgcacca ccaacaccaa ggagggtccc      900
aacatctgcc tgaccggac cgaccggggc tggactgog acaacgccgg ctccgtgtcc      960
ttcttccctc tggccgagac ctgcaaggtg cagtccaacc ggggtttctg cgacaccatg    1020
aactccctga cctgccttc cgaggtgaac ctgtgcaaca tcgacatctt caaccccaag    1080
tacgactgca agatcatgac cagcaagacc gacgtgtcct ccagegtgat cacctccctg    1140
ggcgccatcg tgtcctgcta cggcaagacc aagtgcaccg cctccaacaa gaaccgggga    1200
atcatcaaga ccttctcaa cggctgcgac tacgtgtcca ataagggcgt ggacaccgtg    1260
tcogtgggca acacactgta ctacgtgaat aagcaggagg gcaagagcct gtacgtgaag    1320
ggcgagccta tcatcaactt ctacgacctt ctgggtttcc cttccgacga gttcgacgcc    1380
tccatcagcc aggtgaacga gaagatcaac gggaccctgg ccttcatccg gaagtccgac    1440
gagaagctgc ataactgga ggacaagatc gaggagatcc tgtccaaaat ctaccacatc    1500
gagaacgaga tcgcccggat caagaagctg atcgccgagg cc                          1542

```

```

<210> 22
<211> 514
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> Синтетический полипептид PreF

```

```

<400> 22

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

023054

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Phe Leu Gly Phe Leu Gln
 100 105 110

Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu
 115 120 125

His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr
 130 135 140

Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser
 145 150 155 160

Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile
 165 170 175

Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu
 180 185 190

Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser
 195 200 205

Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn
 210 215 220

Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln
 225 230 235 240

Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr
 245 250 255

Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln
 260 265 270

Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr
 275 280 285

Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu
 290 295 300

Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser
 305 310 315 320

Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe
 325 330 335

Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys
 340 345 350

Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser
 355 360 365

Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val
 370 375 380

Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly
 385 390 395 400

Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly
 405 410 415

Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln
 420 425 430

Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr
 435 440 445

Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln
 450 455 460

Val Asn Glu Lys Ile Asn Gly Thr Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp
 465 470 475 480

Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys
 485 490 495

Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly
 500 505 510

Glu Ala

