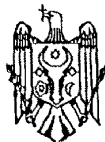




MD/EP 3439672 T2 2021.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3439672 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61K 35/12 (2015.01.01)
C07K 14/005 (2006.01.01)
A61K 39/12 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0180 (22) Data de depozit: 2017.04.04 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17715692.4, 2017.04.04 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3439672, 2019.02.13 (31) Numărul cererii prioritare: 16163810 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.04.05 (33) Țara cererii prioritare: EP	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 04/2021, 2021.04.30 (80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 48/2020, 2020.11.25 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 03/2019, 2019.03.31
(71) Solicitant: JANSSEN VACCINES & PREVENTION B.V., NL (72) Inventatori: KRARUP Anders, NL; LANGEDIJK Johannes Petrus Maria, NL (73) Titular: JANSSEN VACCINES & PREVENTION B.V., NL (74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela	

(54) Proteine F RVS de pre-fuziune solubile stabilizate pentru utilizare în profilaxia infecțiilor cu RSV

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție se referă la proteine F de pre-fuziune stabilizate (sau fragmentul acestora) ale virusului sincițial respirator (RSV), la compoziții care cuprind proteinele menționate și utilizări ale acestora pentru profilaxia și/sau tratamentul infecției cu RSV.

2

Secvențe: 22
Revendicări: 3
Figuri: 9

MD/EP 3439672 T2 2021.04.30

(54) Stabilized soluble pre-fusion rsv f protein for use in the prophylaxis of rsv infection

(57) Abstract:

1
The present invention provides stable pre-fusion respiratory syncytial virus (RSV) F proteins (or fragment thereof), compositions comprising said proteins and uses thereof for the prevention and/or treatment of RSV

2
infection.
Sequences: 22
Claims: 3
Fig.: 9

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

Prezenta invenție se referă la domeniul medicinei. Invenția se referă în special la proteine
 5 F RSV recombinante de pre-fuziune și la utilizări ale acestora, de ex., ca vaccin.

Stadiul tehnicii

Virusul respirator sincițial (RSV) este un agent patogen al copilăriei extrem de contagios
 al căilor respiratorii, despre care se crede că este responsabil pentru ~200.000 de decese anual în
 10 copilărie. La copiii cu vârsta mai mică de 2 ani, RSV reprezintă aproximativ 50% dintre
 spitalizările din cauza infecțiilor respiratorii, cu un vârf de spitalizare care are loc la vârsta de 2-4
 luni. S-a raportat că aproape toți copiii au avut infecție cu RSV până la vârsta de doi ani, iar
 infecția repetată în timpul vieții este atribuită imunității naturale scăzute. La vârstnici, efectul bolii
 RSV este similar cu cel cauzat de infecțiile cu gripă A nepandemică.

Pentru a infecta o celulă gazdă, RSV, ca și alți viruși anvelopați, cum ar fi, virusul gripal
 și HIV, necesită fuziunea membranei virale cu membrana celulei gazdă. Pentru RSV proteina de
 fuziune conservată (proteina F RSV) fuzionează membranele celulare virale și ale celulelor gazdă.
 În modelele actuale, bazate pe studii de paramixovirus, proteina F RSV se pliază inițial într-o
 conformație "pre-fuziune". Structura metastabilă a fost recent soluționată în complex cu un
 20 fragment Fab de anticorp neutralizant stabilizator (McLellan ș.a., Science 340 (6136): 1113-7,
 2013). În timpul intrării celulei, conformația pre-fuziune suferă modificări conformaționale și de
 re-pliere a conformației sale "post-fuziune" (McLellan, J. Virol 85 (15): 7788-96, 2010; Swanson,
 PNAS 108 (23): 9619-24, 2011). Astfel, proteina F RSV este o proteină metastabilă care
 antrenează fuziunea membranei prin cuplarea re-plierii ireversibile a proteinei la juxtapunerea
 25 membranei prin plierea inițială într-o formă metastabilă (conformație pre-fuziune) care ulterior
 suferă modificări conformaționale discrete/trepate la o conformație de energie inferioară
 (conformație post-fuziune). Aceste observații sugerează că proteina F RSV de pre-fuziune și post-
 fuziune sunt distincte antigenic (Calder, L. J. ș.a. Virology 271, 122-131 (2000)). Din microscopia
 electronică a RSV-F este clar că există diferențe structurale mari între trimerul F de pre-fuziune și
 30 post-fuziune, care au fost confirmate recent prin cristalografie (McLellan J.S. ș.a. Science 340
 (6136): 1113-7 (2013)) și McLellan J.S. ș.a. Science 342 (6158): 592-8 (2013)) și s-a arătat că
 majoritatea anticorpilor neutralizanți din serul indivizilor RSV-pozitivi se leagă de F de pre-
 fuziune (Ngwuta et. al., Science Translational Medicine, 7 (309): 309ra162, 1-9).

Un vaccin împotriva infecției cu RSV nu este disponibil în prezent, dar este dorit.
 35 Candidații la vaccin pe baza proteinei F RSV au eșuat din cauza problemelor cu, de ex.,
 stabilitatea, puritatea, reproductibilitatea și eficiența. Așa cum s-a indicat anterior, structurile
 cristaline au dezvăluit o mare schimbare conformațională între stările de pre-fuziune și post-
 fuziune. Amploarea rearanjării a sugerat că doar o porțiune de anticorpi direcționați către
 conformația post-fuziune a RSV-F va putea reacționa încrucișat cu conformația nativă a vârfului
 40 de pre-fuziune de pe suprafața virusului. În consecință, eforturile de a produce un vaccin împotriva
 RSV s-au concentrat pe dezvoltarea vaccinurilor care conțin forme de pre-fuziune ale proteinei F
 RSV (a se vedea, de ex., WO2010/1149745, WO2010/1149743, WO2009/1079796,
 WO2012/158613). Cu toate acestea, aceste eforturi nu s-au obținut încă proteine F RSV stabile de
 pre-fuziune, care ar putea fi utilizate ca candidați pentru testare la oameni.

Prin urmare, rămâne o nevoie de vaccinuri eficiente și metode de vaccinare împotriva
 45 RSV, în special care cuprind proteine F RSV în conformația de pre-fuziune. Prezenta invenție își
 propune să furnizeze astfel de vaccinuri și metode pentru vaccinarea împotriva RSV într-un mod
 sigur și eficient.

Rezumatul invenției

Invenția este definită în revendicări.

Prezenta invenție furnizează o proteină de fuziune (F) a virusului respirator sincițial pre-
 fuzionat recombinant (RSV), care cuprinde o secvență de aminoacizi a SECV ID NR: 1 pentru
 55 utilizare în profilaxia infecției cu RSV.

Prezenta dezvoltare oferă proteine de fuziune (F) stabile, pentru virusul respirator sincițial
 (RSV) recombinant de pre-fuziune, adică proteine F RSV recombinante în formă solubilă (adică
 nu sunt legate de membrană) care sunt stabilizate în conformația pre-fuziune, în care proteina F
 RSV cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 1,
 SECV ID NR: 2 și SECV ID NR: 3, sau fragmente ale acestora.

În anumite exemple de realizare, proteina de pre-fuziune F RSV pentru utilizare conform invenției cuprinde cel puțin un epitop care este specific proteinei F de conformație pre-fuziune, în care cel puțin un epitop este recunoscut de un anticorp monoclonal specific pre-fuziune care cuprinde o regiune CDR1 a lanțului greu din SECV ID NR: 4, o regiune CDR2 a lanțului greu din SECV ID NR: 5, o regiune CDR3 a lanțului greu din SECV ID NR: 6 și o regiune CDR1 a lanțului ușor din SECV ID NR: 7, o regiunea CDR2 a lanțului ușor din SECV ID NR: 8 și o regiune CDR3 a lanțului ușor din SECV ID NR: 9 și/sau un anticorp monoclonal specific de pre-fuziune, care cuprinde o regiune CDR1 a lanțului greu din SECV ID NR: 10, o regiune CDR2 a lanțului greu din SEQ ID NR: 11, o regiune CDR3 a lanțului greu din SEQ ID NR: 12 și o regiune CDR1 a lanțului ușor din SEQ ID NR: 13, o regiune CDR2 a lanțului ușor din SEQ ID NR: 14 și o regiune CDR3 a lanțului ușor din SECV ID NR: 15.

În anumite exemple de realizare, proteina F RSV de pre-fuziune pentru utilizare conform invenției este trimerică.

Dezvăluirea furnizează, de asemenea, molecule de acid nucleic care codifică proteinele F RSV de pre-fuziune, sau fragmente ale acestora și vectori care cuprind astfel de molecule de acid nucleic.

Dezvăluirea se referă, de asemenea, la compoziții, preferabil compoziții imunogene, care cuprind proteina F RSV de pre-fuziune (sau fragmente ale acesteia), molecula de acid nucleic care codifică respectiva proteină F RSV de pre-fuziune și la utilizarea acestora în inducerea unui răspuns imun împotriva proteinei F RSV, în special pentru utilizarea acestora ca vaccin. Dezvăluirea se referă, de asemenea, la metode pentru inducerea unui răspuns imun la virusul sincițial anti-respirator (RSV) la un subiect, care cuprinde administrarea unui subiect a unei cantități eficiente de proteină F RSV de pre-fuziune, a unei molecule de acid nucleic care codifică respectiva proteină F RSV, și/sau un vector care cuprinde molecula de acid nucleic menționată. De preferință, răspunsul imun indus este caracterizat prin neutralizarea anticorpilor la RSV și/sau imunitatea de protecție împotriva RSV. În anumite aspecte, dezvăluirea se referă la o metodă pentru inducerea anticorpilor de proteină F (RSV) a virusului sincițial anti-respirator la un subiect, care cuprinde administrarea unui subiect a unei cantități eficiente dintr-o compoziție imunogenă care cuprinde o proteină F RSV de pre-fuziune, o moleculă de acid nucleic care codifică proteina F RSV menționată și/sau un vector care cuprinde molecula de acid nucleic menționată.

Scurtă descriere a figurilor

FIG. 1. Reprezentarea schematică a variantelor F RSV. SCDM - mutant dublu monocatenar, SCTM - mutant triplu monocatenar, PRQM - mutant cvadruplu procesat și PRPM - penta-mutant procesat. Proteinele secretate sunt prezentate fără peptidă semnal și fragment p27. Sunt indicate domeniile F1 și F2, precum și peptida de fuziune (FP), domeniul de trimerizare a fibritinei (foldon) și linkerul în proteinele monocatenare dintre F2 și F1 (GSGSG). Trei mutații stabilizatoare (N67I, S215P și D486N) (romburi negre). Două mutații pentru îmbunătățirea potrivirii antigenice cu tulpinile circulante (K66E și I76V) (romburi gri). Poziția restului este numerotată ca în proteina de tip sălbatic de lungime completă, inclusiv peptida semnal.

FIG. 2. Nivelurile de exprimare a proteinelor și stabilitatea de pre-fuziune a variantelor RSV F PR-A2 procesate cu substituții multiple de aminoacizi. Nivelurile de exprimare a proteinelor în supernatantele de cultură celulară au fost testate la 72 de ore după transfecție prin octet cantitativ (Q-Octet) cu CR9501 și CR9503 (bare în stanga) și fracția de proteină F RSV care se leagă la anticorpul CR9501 specific de pre-fuziune în ziua recoltării și după depozitare la 4°C pentru perioada de timp indicată (bare în dreapta). Barele reprezintă media a 2-4 măsurători, liniile reprezintă intervalul de valori.

FIG. 3. Temperaturile de topire (T_m) ale proteinelor RSV-F purificate. Fiecare măsurare este reprezentată printr-un punct.

FIG. 4. Substituțiile de aminoacizi K66E și I76V nu au avut efect asupra nivelurilor de exprimare a proteinelor F și asupra stabilității pre-fuziunii. Nivelurile de exprimare a proteinelor în supernatantele de cultură celulară au fost testate la 96 de ore după transfecție prin Q-Octet cu CR9501 și CR9503 (bare în stânga) și fracția de proteină F RSV care se leagă la anticorpul CR9501 specific de pre-fuziune în ziua recoltării și după depozitare la 4°C pentru perioada de timp indicată (bare în dreapta). Barele reprezintă media a 2 măsurători, liniile reprezintă intervalul de valori.

FIG. 5: Stabilitatea pre-fuziune a variantelor de proteină F în supernatantul de cultură de celule CHO. Nivelurile de exprimare a proteinelor în supernatantele culturii celulare au fost testate la 96 de ore după transfecție prin Q-Octet cu CR9501 și CR9503 și fracția de legare a proteinelor F RSV la anticorpul CR9501 specific de pre-fuziune în ziua recoltării și după depozitare la 4°C pentru perioada indicată de timp. Barele reprezintă media a 2 măsurători, liniile reprezintă intervalul de

valori. PRQM - PR-A2 cu N67I, S215P, K66E și I76V; PRPM - PR-A2 cu N67I, S215P, K66E, I76V și D486N.

FIG. 6: Proteinele F RSV ale invenției rămân intacte în supernatantul culturii de celule CHO la pH5. pH-ul supernatantilor de cultură celulară care conțin variante de proteine F a fost ajustat la pH5 și probele au fost incubate la 7 zile, cu sau fără inhibitori de protează. Probele au fost analizate pe SDS-PAGE în condiții de reducere. Prima bandă a fiecărui gel este un marker de greutate moleculară standard; este indicată dimensiunea proteinelor standard. Probele: 1 - probă de ziua 0; 2 - probă de ziua 7 incubată la 4°C; 3 - probă de ziua 7 incubată la 4°C cu inhibitori de protează; 4 - probă de ziua 0; 5 - probă de ziua 7 incubată la temperatura camerei; 6 - proba de ziua 7 incubată la temperatura camerei cu inhibitori de protează; 7 - proba de ziua 0; 8 - proba de ziua 7 incubată la 37°C; 9 - probă de ziua 7 incubată la 37°C cu inhibitori de protează. În probele de proteine procesate, banda inferioară reprezintă domeniul F1, iar banda superioară reprezintă proteina parțial procesată (F1 + p27), sau proteina F1 + F2 neprocesată. În proba de proteine monocatenare, banda este domeniile F1+F2. PRQM - PR-A2 cu N67I, S215P, K66E și I76V; PRPM - PR-A2 cu N67I, S215P, K66E, I76V și D486N. LNR:K683-065.

FIG. 7 Stabilitatea la temperatură a proteinelor F RSV în supernatantul de cultură de celule CHO. Probele de supernatant au fost supuse tratamentului termic timp de 30 min la temperaturi de 45-65°C. Cantitatea de proteină de pre-fuziune din probă a fost măsurată în ELISA cu anticorpi CR9501. Valorile au fost normalizate la proba netratată (20°C). Curbele sunt prezentate individual pentru fiecare proteină și o suprapunere a tuturor curbilor (în dreapta jos). Fiecare punct reprezintă o măsurătoare replicată. Au fost efectuate două teste cu câte 2 replici tehnice fiecare. Curbele au fost montate utilizând ecuația pantei variabile de regresie neliniară (GraphPad Prism); temperaturile de topire (T_m) au fost calculate ca valori IC₅₀. PRQM - PR-A2 cu N67I, S215P, K66E și I76V; PRPM - PR-A2 cu N67I, S215P, K66E, I76V și D486N.

FIG. 8: titruri de RSV în plămâni și nas la 5 zile după provocarea cu RSV A2. Titrurile RSV în plămâni (panoul superior) și nas (panoul inferior) la 5 zile după provocarea cu RSV A2. Nivelul inferior de detectare (LOD) este indicat printr-o linie punctată. Titrurile medii (log₁₀ pfu pe gram de țesut) sunt indicate cu bare orizontale. Grupurile PRPM adjuvante și non-adjuvante au fost comparate în lungul dozei printr-un test Cochran-Mantel-Haenszel și diferențele statistice sunt indicate în figură. i.m.: intramuscular; i.n.: intranazal.

FIG. 9: Titruri de neutralizare a RSV împotriva RSV A Lung în seruri de șobolani de bumbac în ziua 49 după amorsare. Titrurile de neutralizare a RSV (IC₅₀ (log₂)) împotriva RSV A Long folosind o citire bazată pe ELISA au fost determinate în seruri de șobolan de bumbac în ziua 49 după pregătire. Media fiecărui grup este indicată cu o bară orizontală. Limita de detectare (LOD) este setată la 3.0 (log₂ și indicată cu o linie punctată). Titrurile VNA induse de PRPM prin adjuvant și non-adjuvant au fost comparate în doză de ANOVA și rezultatele sunt indicate în figură. i.m.: intramuscular; i.n.: intranazal.

Descriere detaliată a invenției

Invenția este definită în revendicări.

Proteina de fuziune (F) a virusului sincitial respirator (RSV) este implicată în fuziunea membranei virale cu membrana celulei gazdă, care este necesară pentru infecție. mARN al RSV F este translatat într-o proteină precursor de 574 aminoacizi denumită F0, care conține o secvență de peptidă semnal de 26 de aminoacizi la capătul N-terminal care este îndepărtat de o peptidază semnal în reticulul endoplasmatic. F0 este clivată în două situsuri (între resturile de aminoacizi 109/110 și 136/137) prin proteaze celulare de tip furină în trans-Golgi, îndepărtând o scurtă secvență intermediară glicozilată (menționată, de asemenea, la o regiune p27, care cuprinde resturile de aminoacizi 110 până la 136 și generează două domenii, sau subunități denumite F1 și F2. Domeniul F1 (resturile de aminoacizi 137-574) conține o peptidă de fuziune hidrofobă la capătul său N-terminal și capătul C-terminal conține transmembrana (TM) (resturile de aminoacizi 530-550) și regiunea citoplasmatică (resturile de aminoacizi 551-574). Domeniul F2 (resturile de aminoacizi 27-109) este legat covalent de F1 prin două punți disulfură. Heterodimerii F1-F2 sunt asamblați ca homotrimeri în virion.

Un vaccin împotriva infecției cu RSV nu este disponibil în prezent, dar este dorit. O abordare potențială a producerii unui vaccin este un vaccin subunitar pe bază de proteină F RSV purificată. Cu toate acestea, pentru această abordare este de dorit ca proteina F RSV purificată să aibă o conformație care seamănă cu conformația stării de pre-fuziune a proteinei F RSV și care este stabilă în timp și poate fi produsă în cantități suficiente. În plus, pentru un vaccin pe bază de subunități, proteina F RSV trebuie tăiată prin ștergerea transmembranei (TM) și a regiunii citoplasmice pentru a crea o proteină F secretată solubilă (sF). Deoarece regiunea TM este responsabilă pentru ancorarea și trimerizarea membranei, proteina F solubilă fără ancoră este

considerabil mai labilă decât proteina de lungime completă și se va re-plia cu ușurință în starea finală post-fuziune. Pentru a obține proteina F solubilă în conformația stabilă pre-fuziune care prezintă niveluri ridicate de expresie și stabilitate ridicată, conformația pre-fuziune trebuie astfel stabilizată.

Mai multe mutații care stabilizează proteina F RSV în conformația pre-fuziune au fost descrise anterior în WO2014/174018 și WO2014/202570. Proteinele F RSV pentru utilizare conform prezentei invenții cuprind un subgrup unic și specific de mutații descrise anterior în combinație cu alte două mutații. Conform dezvăluirii s-a arătat că această combinație unică de mutații rezultă în niveluri crescute de exprimare a proteinei F RSV și stabilitatea conformației pre-fuziune.

Prezenta dezvăluire oferă astfel noi proteine RSV F solubile stabile de pre-fuziune, adică proteine F RSV solubile care sunt stabilizate în conformația pre-fuziune, sau fragmente ale acestora. Proteinele F RSV conform prezentei dezvăluiri cuprind o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 1, SECV ID NR: 2 și SECV ID NR: 3.

În cercetarea care a condus la prezenta invenție, a fost introdusă o combinație unică de mutații împreună cu un domeniu de trimerizare heteroloagă pentru a obține proteinele F RSV solubile stabile de pre-fuziune. Proteinele RS-F stabile de pre-fuziune pentru utilizare conform invenției sunt în conformația de pre-fuziune, adică ele cuprind (afișează) cel puțin un epitop care este specific proteinei F de conformare de pre-fuziune. Un epitop care este specific conformației de pre-fuziune a proteinei F este un epitop care nu este prezentat în conformația post-fuziune. Fără dorința de a fi legat de vreo teorie anume, se crede că conformația pre-fuziune a proteinei RSV F poate conține epitopi care sunt identici cu cei de pe proteina F RSV exprimată pe virioni RSV naturali și, prin urmare, poate oferi avantaje pentru obținerea anticorpilor neutralizanți de protecție.

În anumite exemple de realizare, proteinele F de pre-fuziune RSV pentru utilizare conform invenției cuprind cel puțin un epitop care este recunoscut de un anticorp monoclonal specific de pre-fuziune, care cuprinde o regiune CDR1 a lanțului greu din SECV ID NR: 4, o regiune CDR2 a lanțului greu din SECV ID NR: 5, o regiune CDR3 a lanțului greu din SECV ID NR: 6 și o regiune CDR1 a lanțului ușor din SECV ID NR: 7, o regiunea CDR2 a lanțului ușor din SECV ID NR: 8 și o regiune CDR3 a lanțului ușor din SECV ID NR: 9 (denumită în continuare CR9501) și/sau un anticorp monoclonal specific de pre-fuziune, care cuprinde o regiune CDR1 a lanțului greu din SECV ID NR: 10, o regiune CDR2 a lanțului greu din SECV ID NR: 11, o regiune CDR3 a lanțului greu din SECV ID NR: 12 și o regiune CDR1 a lanțului ușor din SECV ID NR: 13, o regiune CDR2 a lanțului ușor din SECV ID NR: 14 și o regiune CDR3 a lanțului ușor din SECV ID NR: 15. (denumită în continuare CR9502). CR9501 și CR9502 cuprind regiunile variabile ale lanțului greu și ușor și, prin urmare, specificitățile de legare, ale anticorpilor 58C5 și respectiv 30D8, care s-au dovedit anterior că se leagă în mod specific la proteina F RSV în conformația sa de pre-fuziune și nu la conformația post-fuziune (așa cum este prezentat în WO2012/006596).

În anumite exemple de realizare, proteinele recombinante F RSV de pre-fuziune sunt trimerice.

Așa cum se utilizează pe parcursul prezentei cereri, secvențele de nucleotide sunt furnizate de la direcția 5' la 3' și secvențele de aminoacizi de la N-terminal la C-terminal, așa cum se obișnuiește în domeniu.

Așa cum s-a indicat anterior, sunt, de asemenea, dezvăluite fragmente ale proteinei F RSV de pre-fuziune.

Fragmentul poate rezulta din una sau ambele ștergeri amino-terminale (de ex., prin scindarea secvenței semnalului) și carboxi-terminale. Fragmentul poate fi ales pentru a cuprinde un fragment activ imunologic al proteinei F, adică o parte care va da naștere unui răspuns imun la un subiect. Acest lucru poate fi ușor determinat folosind metode in silico, in vitro și/sau in vivo, toate de rutină pentru persoanele de specialitate în domeniu.

În anumite exemple de realizare, proteina codificată pentru utilizare conform invenției cuprinde o secvență semnal, denumită și secvență lider sau peptidă semnal, care corespunde aminoacizilor 1-26 din SECV ID NR: 1. Secvențele semnal sunt de obicei secvențe de aminoacizi scurte (de ex., 5-30 aminoacizi lungi) prezente la capătul N-terminal al majorității proteinelor nou sintetizate care sunt destinate spre calea secretorie și sunt de obicei scindate de peptidază semnal pentru a genera o peptidă semnal liberă și o proteină matură.

În anumite exemple de realizare, proteinele utilizate conform invenției nu cuprind o secvență semnal.

Prezenta dezvăluire oferă, în plus, molecule de acid nucleic care codifică proteinele F de pre-fuziune RSV, sau fragmente ale acestora, conform dezvăluirii.

În aspectele preferate ale dezvăluirii, moleculele de acid nucleic care codifică proteinele F RSV sunt optimizate cu codoni pentru exprimare în celule de mamifere, preferabil celule umane.

Metodele de optimizare a codonilor sunt cunoscute și au fost descrise anterior (de ex., WO 96/09378). O secvență este considerată optimizată pentru codoni dacă cel puțin un codon nepreferat în comparație cu o secvență de tip sălbatic este înlocuit cu un codon care este mai preferat. Aici, un codon nepreferat este un codon care este utilizat mai rar într-un organism decât un alt codon care codifică același aminoacid și un codon care este mai preferat este un codon care este utilizat mai frecvent într-un organism decât un codon nepreferat. Frecvența utilizării codonilor pentru un anumit organism poate fi găsită în tabelele de frecvență ale codonilor, cum ar fi, în <http://www.kazusa.or.jp/codon>. De preferință, mai mult de un codon nepreferat, preferabil majoritatea, sau toți codonii nepreferați, sunt înlocuiți cu codoni care sunt mai preferați. De preferință, codonii cei mai frecvent utilizați într-un organism sunt utilizați într-o secvență optimizată pentru codoni. Înlocuirea cu codoni preferați duce în general la o expresie mai mare.

O persoană de specialitate va înțelege că numeroase polinucleotide și molecule de acid nucleic diferite pot codifica aceeași proteină ca urmare a degenerării codului genetic. Se înțelege, de asemenea, că persoanele calificate pot, folosind tehnici de rutină, să facă substituții de nucleotide care nu afectează secvența de proteine codificată de moleculele de acid nucleic pentru a reflecta utilizarea codonilor ai oricărui anumit organism gazdă în care proteinele trebuie exprimate. Prin urmare, dacă nu se specifică altfel, o "secvență de nucleotide care codifică o secvență de aminoacizi" include toate secvențele de nucleotide care sunt versiuni degenerate una de alta și care codifică aceeași secvență de aminoacizi. Secvențele de nucleotide care codifică proteinele și ARN-ul pot include sau nu introni.

Secvențele de acid nucleic pot fi clonate folosind tehnici de rutină de biologie moleculară, sau generate de novo prin sinteza ADN-ului, care poate fi realizată folosind proceduri de rutină de către companiile de servicii care au activități în domeniul sintezei ADN și/sau clonării moleculare (de ex., GeneArt, GenScripts, Invitrogen, Eurofins).

În anumite aspecte ale dezvoltării, moleculele de acid nucleic cuprind o secvență de nucleotide din SECV ID NR 20, 21 sau 22.

Dezvoltarea oferă, de asemenea, vectori care cuprind o moleculă de acid nucleic așa cum s-a descris anterior. În anumite aspecte, o moleculă de acid nucleic conform dezvoltării face astfel parte dintr-un vector. Astfel de vectori pot fi manipulați cu ușurință prin metode bine cunoscute persoanei de specialitate în domeniu și pot fi, de exemplu, proiectați pentru a fi capabili de replicare în celule procariote și/sau eucariote. În plus, mulți vectori pot fi utilizați pentru transformarea celulelor eucariote și se vor integra total sau parțial în genomul acestor celule, rezultând celule gazdă stabile care cuprind acidul nucleic dorit în genomul lor. Vectorul utilizat poate fi orice vector care este adecvat pentru clonarea ADN-ului și care poate fi utilizat pentru transcrierea unui acid nucleic de interes. Persoana de specialitate în domeniu este capabilă să aleagă vectorii de expresie adecvați și să introducă secvențele de acid nucleic ale dezvoltării într-un mod funcțional.

Celulele gazdă care cuprind moleculele de acid nucleic care codifică proteinele F RSV de pre-fuziune formează, de asemenea, o parte a dezvoltării. Proteinele F RSV de pre-fuziune pot fi produse prin tehnologia ADN-ului recombinant care implică expresia moleculelor în celulele gazdă, de ex., Celule ovariene de hamster chinezesc (CHO), linii de celule tumorale, celule BHK, linii de celule umane cum ar fi, celule HEK293, celule PER.C6, sau celule de drojdie, ciuperci, insecte și altele asemenea, sau animale sau plante transgenice. În anumite aspecte, celulele provin dintr-un organism multicelular, în anumite aspecte, sunt de origine vertebrată sau nevertebrată. În anumite aspecte, celulele sunt celule de mamifere. În anumite aspecte, celulele sunt celule umane. În general, producția de proteine recombinante, cum ar fi, proteinele F RSV de fuziune din dezvoltare, într-o celulă gazdă cuprinde introducerea unei molecule de acid nucleic heterolog care codifică proteina în format expresibil în celula gazdă, cultivarea celulelor în condiții care conduc la exprimarea moleculei de acid nucleic și care permit exprimarea proteinei în respectiva celulă. Molecula de acid nucleic care codifică o proteină în format expresibil poate fi sub forma unei casete de expresie și de obicei necesită secvențe capabile să producă expresia acidului nucleic, cum ar fi, amplificator(i), promotor, semnal de poliadenilare și altele asemenea. Persoana de specialitate în domeniu știe că pot fi utilizați diverși promotori pentru a obține expresia unei gene în celulele gazdă. Promotorii pot fi constitutivi sau reglementați și pot fi obținuți din diverse surse, care includ viruși, procariote sau eucariote, sau proiectate artificial.

Mediile de cultură celulară sunt disponibile de la diferiți furnizori și un mediu adecvat poate fi ales în mod obișnuit pentru ca o celulă gazdă să exprime proteina de interes, aici proteinele F RSV de pre-fuziune. Mediul adecvat poate conține sau nu ser.

O "moleculă de acid nucleic heteroloagă" (denumită aici "transgenă") este o moleculă de acid nucleic care nu este prezentă în mod natural în celula gazdă. Aceasta este introdusă, de exemplu, într-un vector prin tehnici standard de biologie moleculară. O transgenă este în general

legată operațional de secvențele de control al expresiei. Acest lucru se poate face, de exemplu, prin plasarea acidului nucleic care codifică transgena(ele) sub controlul unui promotor. Se pot adăuga secvențe de reglare suplimentare. Mulți promotori pot fi utilizați pentru exprimarea transgenelor și sunt cunoscuți de către persoanele de specialitate în domeniu, de ex., acestea pot cuprinde promotori virali, de mamifere, sintetici și alții asemenea. Un exemplu nelimitativ de promotor adecvat pentru obținerea expresiei în celule eucariote este un promotor CMV (US 5.385,839), de ex., promotorul timpuriu imediat CMV, de exemplu, care cuprinde nt. -735 la +95 de la stimulatorul/promotorul timpuriu imediat al genei CMV. Un semnal de poliadenilare, de exemplu, semnalul poliA al hormonului de creștere bovin (US 5.122.458), poate fi prezent în spatele transgenei(lor). Alternativ, mai mulți vectori de expresie utilizați pe scară largă sunt disponibili în domeniu și din surse comerciale, de ex., seriile vectoriale pcADN și pEF de la Invitrogen, pMSCV și pTK-Hyg de la BD Sciences, pCMV-Script de la Stratagene, etc., care pot fi utilizați pentru exprimarea recombinantă a proteinei de interes sau pentru a obține promotori adecvați și/sau secvențe de terminare a transcripției, secvențe polyA și altele asemenea.

Cultura celulară poate fi orice tip de cultură celulară, inclusiv cultura celulară aderentă, de ex., celule atașate la suprafața unui vas de cultură, sau la micropurtători, precum și cultura în suspensie. Cele mai multe culturi în suspensie la scară largă sunt operate ca procese discontinue, sau alimentate în șarjă, deoarece sunt cele mai simple de operat și de extins. În prezent, procesele continue bazate pe principiile perfuziei devin din ce în ce mai frecvente și sunt, de asemenea, adecvate. Mediile de cultură adecvate sunt, de asemenea, bine cunoscute persoanei de specialitate în domeniu și pot fi obținute în general din surse comerciale în cantități mari sau personalizate conform protocoalelor standard. Cultivarea se poate face, de exemplu, în vase, sticle rotative, sau în bioreactoare, utilizând sisteme discontinue, alimentate în șarjă, sisteme continue și altele asemenea. Sunt cunoscute condițiile adecvate pentru cultivarea celulelor (vezi de ex., Tissue Culture, Academic Press, Kruse și Paterson, editori (1973), și R.I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, ediția a patra (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9)).

Dezvăluirea furnizează în plus compoziții care cuprind o proteină F RSV de pre-fuziune și/sau o moleculă de acid nucleic și/sau un vector, așa cum s-a descris anterior. Dezvăluirea oferă astfel compoziții care cuprind o proteină F RSV de pre-fuziune care prezintă un epitop care este prezent într-o conformație de pre-fuziune a proteinei F RSV, dar este absentă în conformația post-fuziune, sau un fragment al acesteia. Dezvăluirea furnizează, de asemenea, compoziții care cuprind o moleculă de acid nucleic și/sau un vector, care codifică o astfel de proteină F RSV de pre-fuziune, sau fragmentul acesteia. Compozițiile sunt, de preferință, compoziții imunogene care cuprind o proteină F RSV de pre-fuziune și/sau o moleculă de acid nucleic și/sau un vector, așa cum s-a descris anterior. Invenția furnizează o proteină de fuziune (F) a virusului sincițial respirator de pre-fuziune recombinant (RSV), care cuprinde un aminoacid din SECV ID NR: 1 pentru utilizare în inducerea unui răspuns imun profilactic împotriva proteinei F RSV la un subiect. Mai este dezvăluită utilizarea proteinelor F RSV de pre-fuziune și/sau a moleculelor de acid nucleic și/sau a vectorilor conform dezvăluirii pentru fabricarea unui medicament pentru utilizare în inducerea unui răspuns imun împotriva proteinei F RSV la un subiect.

Proteina F RSV de fuziune pentru utilizare conform invenției este destinată utilizării în prevenirea (profilaxia) infecțiilor cu VRS. În anumite exemple de realizare, prevenirea poate fi direcționată către grupurile de pacienți care sunt susceptibili la infecția cu VRS. Astfel de grupuri de pacienți includ, dar nu se limitează la de ex., pacienți vârstnici (de ex., ≥ 50 de ani, ≥ 60 de ani și, de preferință, ≥ 65 de ani), tinerii (de ex., ≤ 5 ani, ≤ 1 an), spitalizați și pacienții care au fost tratați cu un compus antiviral, dar au prezentat un răspuns antiviral inadecvat.

Proteina F RSV de pre-fuziune pentru utilizare conform invenției poate fi utilizată de ex., în profilaxia autonomă a unei boli, sau afecțiuni cauzate de RSV, sau în combinație cu alte tratamente profilactice și/sau terapeutice, cum ar fi, vaccinuri, agenți antivirali și/sau anticorpi monoclonali.

Invenția oferă, în plus, metode pentru prevenirea infecției cu RSV la un subiect care utilizează proteina F RSV de pre-fuziune, care cuprinde o secvență de aminoacizi a SECV ID NR.1. Într-un exemplu de realizare specific, o metodă pentru prevenirea infecției cu RSV la un subiect cuprinde administrarea unui subiect care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente de proteină F RSV de pre-fuziune care cuprinde o secvență de aminoacizi a SECV ID NR.1.

O cantitate eficientă terapeutic se referă la o cantitate de proteină, moleculă de acid nucleic sau vector, care este eficientă pentru prevenirea, ameliorarea și/sau tratarea unei boli sau afecțiuni rezultate din infecția cu RSV. Prevenirea cuprinde inhibarea sau reducerea răspândirii RSV, sau inhibarea sau reducerea debutului, dezvoltării sau progresiei unuia sau mai multor simptome asociate cu infecția cu RSV. Ameliorarea, așa cum este utilizată aici, se poate referi la

reducerea simptomelor vizibile sau perceptibile ale bolii, a viremiei sau oricărei alte manifestări măsurabile a infecției cu RSV.

Pentru administrarea la subiecți, cum ar fi oamenii, invenția poate folosi compoziții farmaceutice care cuprind o proteină RSV de pre-fuziune care cuprinde o secvență de aminoacizi a SECV ID NR.1 și un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic. În contextul actual, termenul "acceptabil farmaceutic" înseamnă că purtătorul sau excipientul, la dozele și concentrațiile utilizate, nu va provoca efecte nedorite sau dăunătoare subiecților cărora li se administrează. Astfel de purtători și excipienți acceptabili farmaceutici sunt bine cunoscuți în domeniu (a se vedea Remington's Pharmaceutical Sciences, ediția a 18-a, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer și L. Hovgaard, Eds., Taylor și Francis și Handbook of Pharmaceutical Excipients, ediția a III-a, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press). Proteinele F RSV sunt formulate și administrate, de preferință, ca o soluție sterilă, deși poate fi, de asemenea, posibil să se utilizeze preparate liofilizate. Soluțiile sterile sunt preparate prin filtrare sterilă, sau prin alte metode în sine cunoscute în domeniu. Soluțiile sunt apoi liofilizate sau umplute în recipiente farmaceutice de dozare. pH-ul soluției este în general în domeniul pH-ului de la 3,0 până la 9,5, de ex., pH 5,0 până la 7,5. Proteinele F RSV sunt de obicei într-o soluție care are un tampon farmaceutic acceptabil adecvat și compoziția poate conține, de asemenea, o sare. Opțional poate fi prezent agent de stabilizare, cum ar fi, albumina. În anumite exemple de realizare, se adaugă detergent. În anumite exemple de realizare, proteinele F RSV pot fi formulate într-un preparat injectabil.

În anumite exemple de realizare, o compoziție pentru utilizare conform invenției mai cuprinde unul sau mai mulți adjuvanți. Adjuvanții sunt cunoscuți în domeniu pentru a crește în continuare răspunsul imun la un determinant antigenic aplicat. Termenii "adjuvant" și "stimulent imun" sunt utilizați aici în mod interschimbabil și sunt definiți ca una sau mai multe substanțe care determină stimularea sistemului imunitar. În acest context, un adjuvant este utilizat pentru a spori un răspuns imun la proteinele F RSV pentru utilizare conform invenției. Exemplele de adjuvanți adecvați includ sărurile de aluminiu, cum ar fi, hidroxidul de aluminiu și/sau fosfatul de aluminiu; compoziții ulei-emulsie (sau compoziții ulei-in-apă), inclusiv emulsii squalenă-apă, cum ar fi, MF59 (vezi de ex., WO 90/14837); formulări de saponină, cum ar fi, de exemplu QS21 și Complexe de Imunostimulare (ISCOMS) (vezi de ex., US 5.057.540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); derivați bacterieni sau microbieni, dintre care exemplele sunt lipida Al monofosforil (MPL), MPL 3-O-deacilat (3dMPL), motivul CpG care conține oligonucleotide, toxine bacteriene ADP-ribozilante, sau mutanți ai acestora, precum E. coli enterotoxina LT labilă la căldură, toxina holerei CT și altele asemenea; proteine eucariote (de ex., anticorpi sau fragmente ale acestora (de ex., îndreptate împotriva antigenului insuși, sau CD1a, CD3, CD7, CD80) și liganzi la receptori (de ex., CD40L, GMCSF, GCSF, etc.), care stimulează răspunsul imun la interacțiunea cu celulele receptor. În anumite exemple de realizare compozițiile pentru utilizare conform invenției cuprind aluminiu ca adjuvant, de ex., sub formă de hidroxid de aluminiu, fosfat de aluminiu, fosfat de aluminiu și potasiu, sau combinații ale acestora, în concentrații de 0,05 - 5 mg, de ex., de la 0,075-1,0 mg, de conținut de aluminiu pe doză.

Proteinele F RSV de pre-fuziune pot fi administrate, de asemenea, în combinație cu, sau conjugate cu nanoparticule, cum ar fi, de ex., polimeri, lipozomi, virozomi, particule de tip virus, sau particule de proteine auto-asamblate. Proteinele F de pre-fuziune pot fi combinate cu, încapsulate sau conjugate cu nanoparticulele cu, sau fără adjuvant. Încapsularea în lipozomi este descrisă, de ex., în US 4.235.877. Conjugarea cu macromoleculele este dezvăluită, de exemplu, în US 4.372,945 sau US 4.474.757.

În alte exemple de realizare, compozițiile nu cuprind adjuvanți.

În anumite aspecte, dezvăluirea furnizează metode pentru prepararea unui vaccin împotriva virusului sincițial respirator (RSV), care cuprind furnizarea unei compoziții conform dezvăluirii și formularea acesteia într-o compoziție acceptabilă farmaceutic. Termenul "vaccin" se referă la un agent, sau la o compoziție care conține o componentă activă, eficientă pentru a induce un anumit grad de imunitate la un subiect împotriva unui anumit agent patogen, sau a unei boli, care va avea ca rezultat cel puțin o scădere (până la absența completă) a severității, duratei sau a altei manifestări a simptomelor asociate cu infecția prin agentul patogen sau a bolii. În prezenta dezvăluire, vaccinul cuprinde o cantitate eficientă de proteină F RSV de pre-fuziune și/sau o moleculă de acid nucleic care codifică o proteină F RSV de pre-fuziune și/sau un vector care cuprinde molecula de acid nucleic menționată, care are ca rezultat un răspuns imun împotriva proteinei F RSV. Aceasta oferă o metodă de prevenire a bolilor grave ale tractului respirator inferior, care duc la spitalizare și de scădere a frecvenței complicațiilor, cum ar fi, pneumonia și bronșiolita datorate infecției cu RSV și replicării la un subiect. Termenul "vaccin" conform dezvăluirii implică faptul că este o compoziție farmaceutică și, prin urmare, include în mod uzual un diluant, purtător sau

excipient acceptabil farmaceutic. Acesta poate conține, sau nu alte ingrediente active. În anumite exemple de realizare acesta poate fi un vaccin combinat care cuprinde, în plus, alte componente care induc un răspuns imun, de ex., împotriva altor proteine ale RSV și/sau împotriva altor agenți infecțioși. Administrarea altor componente active se poate face, de exemplu, prin administrare separată sau prin administrarea de produse combinate ale vaccinurilor din dezvoltare și ale altor componente active.

Compozițiile pot fi administrate unui subiect, de ex., un subiect uman. Doza totală de proteine F RSV într-o compoziție pentru o singură administrare poate fi, de exemplu, de aproximativ 0,01 μg până la aproximativ 10 mg, de ex., 1 μg - 1 mg, de ex., 10 μg - 100 μg. Determinarea dozei recomandate va fi efectuată prin experimentare și este de rutină pentru specialiștii în domeniu.

Administrarea compozițiilor conform invenției poate fi realizată folosind căi standard de administrare. Exemplele nelimitative includ administrarea parenterală, cum ar fi, administrarea intradermică, intramusculară, subcutanată, transcutanată sau mucozală, de ex., intranasal, oral și altele asemenea. Într-un exemplu de realizare, o compoziție este administrată prin injecție intramusculară. Persoana de specialitate în domeniu cunoaște diferitele posibilități de administrare a unei compoziții, de ex., un vaccin, pentru a induce un răspuns imun la antigenul(ii) în vaccin.

Un subiect așa cum este utilizat aici este de preferință un mamifer, de ex., un rozător, de ex., un șoarece, un șobolan de bumbac, sau un primat non-uman, sau un om. De preferință, subiectul este un subiect uman.

Proteinele, moleculele de acid nucleic, vectorii și/sau compozițiile pot fi, de asemenea, administrate, fie ca prim, fie ca rapel, într-un regim homolog sau heterolog de prim-rapel. Dacă se efectuează o vaccinare de rapel, de obicei, o astfel de vaccinare de rapel va fi administrată aceluiași subiect la un moment cuprins între o săptămână și un an, de preferință între două săptămâni și patru luni, după administrarea compoziției subiectului pentru prima dată (care este, în astfel de cazuri, denumită 'vaccinare inițială'). În anumite exemple de realizare, administrarea cuprinde o administrare primă și cel puțin una de rapel.

În plus, proteinele din dezvoltare pot fi utilizate ca instrument de diagnosticare, de exemplu, pentru a testa starea imunitară a unei persoane, stabilind dacă există anticorpi în serul unei astfel de persoane capabili să se lege de proteina dezvoltării. Dezvoltarea se referă, de asemenea, la o metodă de diagnosticare in vitro pentru detectarea prezenței unei infecții cu RSV la un pacient, metoda menționată cuprinzând etapele a) contactării unei probe biologice obținute de la pacientul menționat cu o proteină conform invenției; și b) detectarea prezenței complexelor anticorp-proteină.

Exemple

EXEMPLUL 1: Generarea proteinei F RSV de pre-fuziune stabilă

Au fost produse mai multe variante de proteină F RSV de pre-fuziune, care sunt reprezentate schematic în Fig.1. Toți candidații cuprind un domeniu de trimerizare a fibrinei (foldon) (GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL), legat de restul de aminoacizi 495 al domeniului RSV A2 F1.

În versiunile procesate ale F RSV (adică versiunile care sunt scindate înlăturând regiunea p27) substituția N67I a avut cel mai puternic efect atât asupra nivelului de expresie, cât și asupra stabilității, dar proteina F de pre-fuziune complet stabilă a fost obținută numai atunci când substituțiile 67 și 215 au fost combinate, rezultând o creștere a nivelului de expresie de 20 de ori (Fig. 2). Adăugarea unei a treia substituții de aminoacizi nu a îmbunătățit nivelul de expresie sau stabilitatea măsurată prin stabilitatea la depozitare la 4°C. Cu toate acestea, când proteinele F RSV au fost purificate și caracterizate în continuare, s-a dovedit că a treia substituție suplimentară stabilizează semnificativ proteina F de pre-fuziune, măsurată prin testul de stabilitate la temperatură mai strictă (prin testul de Fluorimetrie de Scanare Diferențială - DSF) (Fig. 3).

Deoarece tulpina A2 care a fost utilizată ca secvență parentală pentru variantele de proteină F RSV descrise anterior (WO2014/174018 și WO2014/202570) este o tulpină de laborator adaptată liniei celulare care a acumulat două mutații unice și rare în apexul K66 și I76, s-a decis mutarea acestor două resturi pentru a se potrivi izolatelor clinice naturale (K66E, I76V). Mutațiile K66E și I76V au fost incluse în noul design de proteine procesate pentru a face secvența mai aproape de izolatele virale naturale. Substituțiile K66E + I76V au fost testate în variante stabilize selectate pentru a demonstra că substituțiile de aminoacizi nu au avut efect negativ asupra expresiei sau stabilității proteinelor. S-a arătat că proteinele au fost stabile în supernatantele culturii celulare mai mult de 2 săptămâni. Nu a existat niciun efect negativ asupra nivelului de expresie al proteinelor F, dimpotrivă, proteinei F RSV cu mutații N67I, S215P, K66E și I76V exprimate la un nivel mai înalt decât proteina doar cu N67I și S215P (Fig. 4).

Proteinele F RSV procesate cu N67I, S215P, K66E și I76V (denumite PRQM pentru cvadruplu-mutant procesat) și cu N67I, S215P, K66E, I76V și D486N (denumite PRPM pentru penta-mutant procesat) au fost purificate și caracterizate în continuare.

Screeningul mutațiilor stabilizatoare pentru proteina F RSV a fost efectuat în celule HEK in suspensie (FreeStyle 293F). Aceste celule sunt convenabile de utilizat într-un laborator de cercetare deoarece sunt adaptate la protocolul simplu de transfecție și exprimă proteinele la un nivel ridicat. Pentru producția de proteine pe scară largă și GMP, celulele CHO sunt adesea linia celulară aleasă. Prin urmare, expresia și stabilitatea mai multor modele de proteine F preferate au fost testate în celule CHO in suspensie (FreeStyle CHO-S). Celulele CHO-S sunt dificil de transfectat și, prin urmare, se aștepta ca nivelurile generale de expresie să fie mai mici decât în celulele HEK. Prin urmare, în timpul analizei ne-am concentrat asupra exprimării relative a proteinelor și a stabilității acestora.

Cinci proteine procesate au fost selectate pentru test. Cele 5 variante conțineau toate substituțiile K66E, I76V, N67I și S215P. Așa cum s-a descris anterior, ultimele 2 sunt necesare pentru a stabili proteina în conformația pre-fuziune; primele două au fost incluse pentru a face secvența mai aproape de izolatele naturale (așa cum a fost descris în secțiunea anterioară). Proteinele s-au deosebit de mutațiile suplimentare E161P, D486N și E487Q. Acestea au fost alese datorită nivelului ridicat de expresie, stabilității la stocare și impactului redus asupra antigenicității. Toate proteinele au fost exprimate în celule CHO și au stabilitate comparabilă la depozitare. Proteinele F RSV au fost stabile în conformația pre-fuziune atunci când au fost depozitate în supernatante de cultură celulară timp de 2 săptămâni la 4°C (Fig. 5). De asemenea, a fost testată stabilitatea proteinelor F RSV în supernatantul culturii celulare CHO la pH5. Așa cum se arată în Fig. 6 nu a fost detectată nici o degradare după incubarea probelor de proteine timp de 7 zile la temperaturi diferite.

În concluzie, proteinele F RSV ale invenției s-au exprimat în celule CHO și au fost stabile în supernatantii culturii celulare. În plus, a fost testată stabilitatea la temperatură a proteinei. Supernatantii de cultură celulară au fost supuși tratamentului termic și cantitatea de proteină de pre-fuziune din probe a fost măsurată în ELISA cu anticorp CR9501 (Fig. 7).

Varianta cu D486N (proteina PRPM) a fost cea mai stabilă împotriva stresului de temperatură. Adăugarea mutației K498R părea să nu aibă niciun avantaj în comparație cu proteina cu cantitate minimă de modificare (PRQM). Exemplele cu mutație E161P au avut cele mai ridicate niveluri de expresie (datele nu sunt prezentate). Cu toate acestea, dezavantajul acestei substituții de aminoacizi a fost că restul 161 este situat pe suprafața proteinei și pe marginea epitopului pentru anticorpul CR9501.

Conform prezentei invenții, s-a arătat astfel că PRPM (proteina F RSV cu domeniu de trimerizare a foldonului cu fibrină și cu mutații N67I, S215P, K66E, I76V și D486N, SECV ID NR: 1) și PRQM (proteina F RSV cu fibrină domeniu de trimerizare a foldonului și cu N67I, S215P, K66E și I76V, SECV ID NR: 2) ca proteină prelucrată de pre-fuziune cu minimum de modificări necesare ale secvenței, precum și variantele PRQM + S46G, sau PRPM + S46G, toate sunt stabilizate în conformația pre-fuziune și prezintă un T_m ridicat (Tabelul 1). Ultimele variante cu substituție S46G au un nivel de expresie semnificativ mai ridicat.

Tabelul 1.

ID proteină	Stabilitate la îngheț-dezgheț	T _m (°C)
PRQM S46G	Stabilă pentru 3 cicluri, agregare după 5 cicluri	56,2
PRPM S46G	Stabil pentru 5 cicluri	63,6
PRPM	Stabil pentru 5 cicluri	65,0

EXEMPLUL 2: Imunogenitatea și protecția induse de PRPM cu și fără adjuvant

A fost efectuat un experiment pentru a determina eficacitatea imunogenă și profilactică a proteinei PRPM recombinantă în prezența sau absența unui adjuvant într-un model de șobolan de bumbac de provocare cu RSV-A2 omolog. Animalele au fost imunizate i.m. în ziua 0 și 28 cu 2 doze de PRPM (5 și 0,5 μg), non-adjuvant sau adjuvant cu 100 μg Adjuphos. Animalele au fost provocate în ziua 49 cu 10⁵ (pfu) RSV A2. Animalele au fost sacrificate la 5 zile după provocare și titrurile au fost măsurate în plămâni și nas.

Rezultate

- 5 Imunizarea cu PRPM adjuvantat a indus o protecție completă în plămâni și nas, cu excepția unui animal care a prezentat o dezvoltare în nas. Majoritatea animalelor cărora li s-au administrat 5 și 0,5 μg PRPM neadjuvantat au prezentat o dezvoltare în plămâni și nasuri și a existat o diferență semnificativă între grupurile care au primit proteina adjuvantată și cea neadjuvantată (Figura 8). Proteina adjuvantată a indus titruri de VNA semnificativ mai mari comparativ cu proteina neadjuvantată în ziua 49 după imunizare (Figura 9).

Tabelul 1: Secvențe de anticorpi

Ab	domeniul VH	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
CR9501	Aminoacizi 1-125 SECV ID NR:16	GASINSDNYWT (SECV ID NR:4)	HISYTGNTYYTPSLKS (SECV ID NR:5)	CGAYVLISNCWFDS (SECV ID NR:6)
CR9502	Aminoacizi 1-121 SECV ID NR:18	GFTFSGHTIA (SECV ID NR:10)	WVSTNNGNTEYAQKIQ G (SECV ID NR:11)	EWLVMGGFAFDH (SECV ID NR:12)

Ab	domeniul VH	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
CR9501	Aminoacizi 1-107 SECV ID NR:17	QASQDISTYLN (SEQ (SECV ID NR:7)	GASNLET (SECV ID NR:8)	QQYQYLPYT (SECV ID NR:9)
CR9502	Aminoacizi 1-110 SECV ID NR:19	GANNIGSQNVH (SECV ID NR:13)	DDDRPS (SECV ID NR:14)	QVWDSSRDQAVI (SECV ID NR:15)

10 **Secvențe****SECV ID NR: 1 PRPM**

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNKEIKCNGTDAKYKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRRELPRFMN
 YTLNNAKKTNTLSKKRKRRLFLGFLGVSASIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLS
 TNKAVVSLSNGVSVLTSTKVLDLKNYIDKQLLPVKNQSCSIPNIETVIEFQQKNNRLL
 ITREFSVNAGVTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI
 IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSLNCLTRTDRGWYCDNAGS
 VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
 ITS LGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVKNQE
 GKS LYVKGEPIINFYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLSAIGGYIPEAP
 RDGQAYVRKDGGEWVLLSTFL

SECV ID NR: 2 PRQM

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE
 LSNKEIKCNGTDAKYKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMN
 YTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLGVSIAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLS
 TNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNBKQSCSIPIETVIEFQQKNNRLL
 ITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI
 IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGS
 VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNBKQ
 GKSLEYVKGEPIINFYDPLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAP
 RDGQAYVRKDGWVLLSTFL

SECV ID NR: 3 PRPM + S46G

MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLGALRTGWYTSVITI
 ELSNIKEIKCNGTDAKYKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMN
 YTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLGVSIAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLS
 TNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPIVNBKQSCSIPIETVIEFQQKNNRLL
 ITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI
 IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGS
 VSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
 ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNBKQ
 GKSLEYVKGEPIINFYDPLVFPSNEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLESAIGGYIPEAP
 RDGQAYVRKDGWVLLSTFL

CR9501 lanț greu (SECV ID NR:16)

QVQLVQSGPGLVKPSQTLALTCNVSGASINSNYYWTWIRQRPGGGLEWIGHISYTG
 NTYYTPSLKSRLSMSLETSQSQFSLRLTSVTAADSAVYFCAACGAYVLISNCGWFDS
 WGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

CR9501 lanț ușor (SECV ID NR:17)

EIVMTQSPSSLSASIGDRVTITCQASQDISTYLNWYQQKPGQAPRLLIYGASNLETGVP
 SRFTGSGYGTDFSVTISSLQPEDATYYCQQYQYLPYTFAPGTKVEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS
 LSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

CR9502 lanț greu (SECV ID NR:18)

EVQLQLQSGAELKKPGASVKISCKTSGFTFSGHTIAWVRQAPGQGLEWMGWVSTNNG
 NTEYAQKIQGRVTMTMDTSTSTVYMEIRSLTSDDTAVYFCAREWLVMGGAFAFDHW
 GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC

CR9502 lanț ușor (SECV ID NR: 19)

QSVLTQASSVSVAPGQTARITCGANNIGSQNVHWYQQKPGQAPVLLVYDDRDRPSG
 IPDRFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSRDQAVIFGGGKLTIVLGQPK
 AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
 NNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTIAPTECS

Secvența de nucleotide care codifică PRPM (SECV ID NR:20):

ATGGAAGTCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGCCGTGACCTTCTGCTCGCCAGCG
 GCCAGAACATCACCAGGAATTCTACCAGAGCACCTGTAGCGCCGTGTCCAAGGGCTACCTGAGCGCCCTGA
 GAACCGGCTGGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGAGCAACATCAAGGAAATCAAGTGCAACGGCACCG
 ACGCCAAGGTCAAGCTGATCAAGCAGGAAGTGGACAAGTACAAGAACGCCGTGACCGAGCTGCAGCTGCTG
 ATGCAGAGCACCCCGCCACCAACAACCGGGCCAGACGCGAGCTGCCCCGGTTCATGAAGTACACCTGAAC
 AACGCCAAAAAGACCAACGTGACCCTGAGCAAGAAGCGGAAGCGGCGGTTCTCTGGGCTTCTGCTGGGCGT
 GGGCTCTGCCATTGCTAGCGGCGTGGCCGTGTCTAAGGTGCTGCACCTGGAAGGCGAAGTGAACAAGATCAA
 GAGCGCCCTGCTGAGACCAACAAGGCGTGGTGTCCCTGAGCAACGGCGTGTCCGTGCTGACCAGCAAGGT
 GCTGGATCTGAAGAAGTACATCGACAAGCAGCTGTGCCATCGTGAACAAGCAGAGCTGCAGCATCCCCAA
 CATCGAGACAGTGATCGAGTTCAGCAGAAGAACAACCGGCTGCTGGAAATCACCCGCGAGTTCAGCGTGAA
 CGCTGGCGTGACCACCCCGTGTCCACCTACATGCTGACCAACAGCGAGCTGCTGAGCCTGATCAACGACATG
 CCCATCACCACGACCAGAAAAAGCTGATGAGCAACAACGTGCAGATCGTGCGGCAGCAGAGCTACTCCATC
 ATGAGCATCATCAAAGAAGAGGTGCTGGCTACGTGGTGCAGCTGCCCTGTACGGCGTGATCGACACCCCC
 TGCTGGAAGCTGCACACCAGCCCCCTGTGCACCACCAACACCAAGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACCCGG
 ACCGACCGGGGCTGGTACTGCGATAATGCCGGCTCCGTGTCTTCTTCCACAGGCCGAGACATGCAAGGTGC
 AGAGCAACCGGGTGTCTGCGACACCATGAACAGCCTGACCCTGCCCTCCGAAGTGAACCTGTGCAACGTGG
 ACATCTTCAACCTAAGTACGACTGCAAGATCATGACCAGCAAGACCGACGTGTCCAGCTCCGTGATCACCTC
 CCTGGGCGCCATCGTGTCTGCTACGGCAAGACCAAGTGACCGCCAGCAACAAGAACCGGGGCATCATCAA
 GACCTTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGTCCAACAAGGGGGTGGACACCGTGTCCGTGGGCAACACCTGTA
 CTACGTGAACAACAGGAAGGCAAGAGCCTGTACGTGAAGGGCGAGCCCATCAACTTCTACGACCCCTT
 GGTGTTCCCCAGCAACGAGTTCGACGCCAGCATCAGCCAGGTCAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCTT
 CATCAGAAAGAGCGACGAGCTGCTGTCCGCCATCGGCGGCTACATCCCCGAGGCCCTAGAGATGGCCAGGC
 CTACGTGCGGAAGGACGGCGAGTGGGTGCTGCTGTCTACCTTCTG

Secvența de nucleotide care codifică PRQM (SECV ID NR:21):

ATGGAACTGCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGCCGTGACCTTCTGCTTCGCCAGCG
GCCAGAACATCACCAGGGAATTCTACCAGAGCACCTGTAGCGCCGTGTCCAAGGGCTACCTGAGCGCCCTGA
GAACCGGCTGGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGAGCAACATCAAGGAAATCAAGTGCAACGGCACCG
ACGCCAAGGTCAAGCTGATCAAGCAGGAAGTGGACAAGTACAAGAACGCCGTGACCGAGCTGCAGCTGCTG
ATGCAGAGCACCCCCGCCACCAACAACGGGCCAGACGCGAGCTGCCCCGGTTCATGAACTACACCCTGAAC
AACGCCAAAAAGACCAACGTGACCCTGAGCAAGAAGCGGAAGCGGCGGTTCTGCGCTTCTGCTGGGCGT
GGGCTCTGCCATTGCTAGCGGCGTGGCCGTGTCTAAGGTGCTGCACCTGGAAGGCGAAGTGAACAAGATCAA
GAGCGCCCTGCTGAGCACCAACAAGGCCGTGGTGTCCCTGAGCAACGGCGTGTCCGTGCTGACCAGCAAGGT

GCTGGATCTGAAGAACTACATCGACAAGCAGCTGCTGCCCATCGTGAACAAGCAGAGCTGCAGCATCCCCAA
CATCGAGACAGTGATCGAGTTCAGCAGAAGAACAACCGGCTGCTGGAAATCACCCGCGAGTTCAGCGTGAA
CGCTGGCGTGACCACCCCGTGTCCACCTACATGCTGACCAACAGCGAGCTGCTGAGCCTGATCAACGACATG
CCCATCACCAACGACCAGAAAAAGCTGATGAGCAACAACGTGCAGATCGTGCGGCAGCAGAGCTACTCCATC
ATGAGCATCATCAAAGAAGAGGTGCTGGCCTACGTGGTGCAGCTGCCCTGTACGGCGTGATCGACACCCCC
TGCTGGAAGCTGCACACCAGCCCCCTGTGCACCACCAACACCAAAGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACCCGG
ACCGACCGGGGCTGGTACTGCGATAATGCCGGTCCGTGTATTCTTTCCACAGGCCGAGACATGCAAGGTGC
AGAGCAACCGGGTGTCTGCGACACCATGAACAGCCTGACCCTGCCCTCCGAAGTGAACCTGTGCAACGTGG
ACATCTTAACCCTAAGTACGACTGCAAGATCATGACCAGCAAGACCGACGTGTCCAGCTCCGTGATCACCTC
CCTGGGCGCCATCGTGTCTGCTACGGCAAGACCAAGTGCACCGCCAGCAACAAGAACCGGGGCATCATCAA
GACCTTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGTCCAACAAGGGGTGGACACCGTGTCCGTGGGCAACACCCTGTA
CTACGTGAACAAACAGGAAGGCAAGAGCCTGTACGTGAAGGGCGAGCCCATCATCAACTTCTACGACCCCTT
GGTGTCCCCAGCGACGAGTTCGACGCCAGCATCAGCCAGGTCAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCTT
CATCAGAAAGAGCGACGAGCTGCTGTCCGCCATCGGCGGCTACATCCCCGAGGCCCTAGAGATGGCCAGGC
CTACGTGCGGAAGGACGGCGAGTGGGTGCTGCTGTCTACCTTCCTG

Secvența de nucleotide care codifică PRPM + S46G (SECV ID NR: 22)

ATGGAAGTCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGCCGTGACCTTCTGCTTTGCCAGCG
GCCAGAACATCACCGAGGAATTCTACCAGAGCACCTGTAGCGCCGTGTCCAAGGGCTATCTGGGCGCCCTGA
GAACCGGCTGGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGAGCAACATCAAAGAAATCAAGTGCAACGGCACCG
ACGCCAAAGTGAAGCTGATCAAGCAGGAACTGGACAAGTACAAGAATGCCGTGACCGAACTGCAGCTGCTGA
TGCAGAGCACCCCCGCCACCAACAACCGGGCCAGAAGAGAACTGCCAGATTCTGAACTACACCCTGAACA
ACGCCAAAAAGACCAACGTGACCCTGAGCAAGAAGCGGAAGCGCGGTTCTGGGCTTTCTGCTGGGAGTG
GGAAGCGCCATTGCTAGCGGAGTGCCGTGTCTAAGGTGCTGCACCTGGAAGGCGAAGTGAACAAGATCAA
GAGCGCCCTGCTGAGCACCAACAAGGCCGTGGTGTCTGAGCAACGGCGTGTCCGTGCTGACCAGCAAGGT
GCTGGATCTGAAGAACTACATCGACAAACAGCTGCTGCCATCGTGAACAAGCAGAGCTGCAGCATCCCCAAC
ATCGAGACAGTGATCGAGTTCAGCAGAAGAACAACCGGCTGCTGGAAATCACCCGCGAGTTCAGCGTGAAC
GCTGGCGTGACCAACCCCGTGTCCACCTACATGCTGACCAACAGCGAGCTGCTGTCCCTGATCAACGACATGC
CCATACCAACGACCAGAAAAAGCTGATGAGCAACAACGTGCAGATCGTGCGGCAGCAGAGCTACTCCATCA
TGAGCATTATCAAAGAAGAGGTGCTGGCCTACGTGGTGCAGCTGCCTCTGTACGGCGTGATCGACACCCCTG
CTGGAAGCTGCACACCAGCCCTCTGTGCACCACCAACACCAAAGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACCCGGACC
GACAGAGGCTGGTACTGCGATAATGCCGGCTCCGTCTATTCTTTCCACAAGCCGAGACATGCAAGGTGCAGA
GCAACCGGGTGTCTGCGACACCATGAACAGCCTGACCCTGCCCTCCGAAGTGAATCTGTGCAACGTGGACAT
CTTCAACCCTAAGTACGACTGCAAGATCATGACCTCCAAGACCGACGTGTCCAGCTCCGTGATCACAAGCCTG
GGCGCCATCGTGTCTGCTACGGCAAGACCAAGTGACCGCCAGCAACAAGAACCGGGGCATCATCAAGACC
TTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGTCCAACAAGGGGGTGGACACCGTGTCTGTGGGCAACACCCTGTACTAC
GTGAACAAACAGGAAGGCAAGAGCCTGTACGTGAAGGGCGAGCCCATCATCAACTTCTACGACCCCTGGTG
TTCCCCAGCAACGAGTTCGACGCCAGCATCAGCCAAGTGAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCTTCATCA
GAAAGTCCGATGAGCTGCTGAGCGCCATCGGCGGCTACATCCCTGAGGCCCTAGAGATGGCCAGGCCTATG
TGCGGAAGGACGGCGAATGGGTGCTGCTGTCTACCTTTCTG

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- DATABASE Geneseq [Online] 18 December 2014 (2014-12-18), "RSV fusion protein N67I S215P, RSV CL57-v224, fibritin, SEQ: 74.", XP002761983, retrieved from EBI accession no. GSP:BBP75438 Database accession no. BBP75438
- WO-A1-2014/174018

(57) Revendicări:

1. Proteină de fuziune (F) a virusului sincițial respirator (RSV) de pre-fuziune recombinant, care cuprinde o secvență de aminoacizi a SECV ID NR: 1 pentru utilizare în profilaxia infecției cu RSV.

2. Proteina F RSV de fuziune; pentru utilizare conform revendicării 1, care cuprinde cel puțin un epitop care este specific proteinei F de conformație pre-fuziune, în care cel puțin un epitop este recunoscut de un anticorp monoclonal specific de pre-fuziune, care cuprinde o regiune CDR1 a lanțului greu din SECV ID NR: 4, o regiune CDR2 a lanțului greu din SECV ID NR: 5, o regiune CDR3 a lanțului greu din SECV ID NR: 6 și o regiune CDR1 a lanțului ușor din SECV ID NR: 7, o regiune CDR2 a lanțului ușor din SECV ID NR: 8, și o regiune CDR3 a lanțului ușor din SECV ID NR: 9 și/sau un anticorp monoclonal specific de pre-fuziune, care cuprinde o regiune CDR1 a lanțului greu din SECV ID NR: 10, o regiune CDR2 a lanțului greu din SECV ID NR: 11, o regiune CDR3 a lanțului greu din SECV ID NR: 12 și o regiune CDR1 a lanțului ușor din SECV ID NR: 13, o regiune CDR2 a lanțului ușor din SECV ID NR: 14 și o regiune CDR3 a lanțului ușor din SECV ID NR: 15.

3. Proteină F RSV de pre-fuziune pentru utilizare conform revendicării 1 sau 2, în care proteina este trimerică.

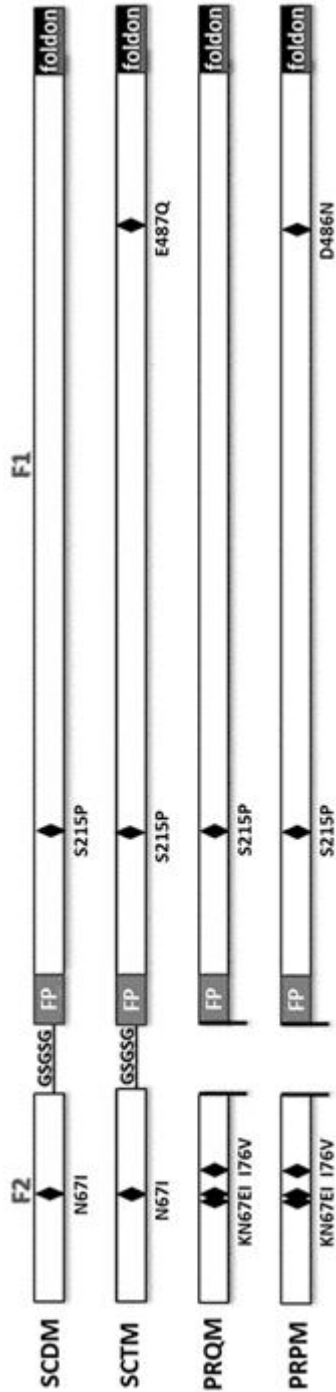


FIG. 1

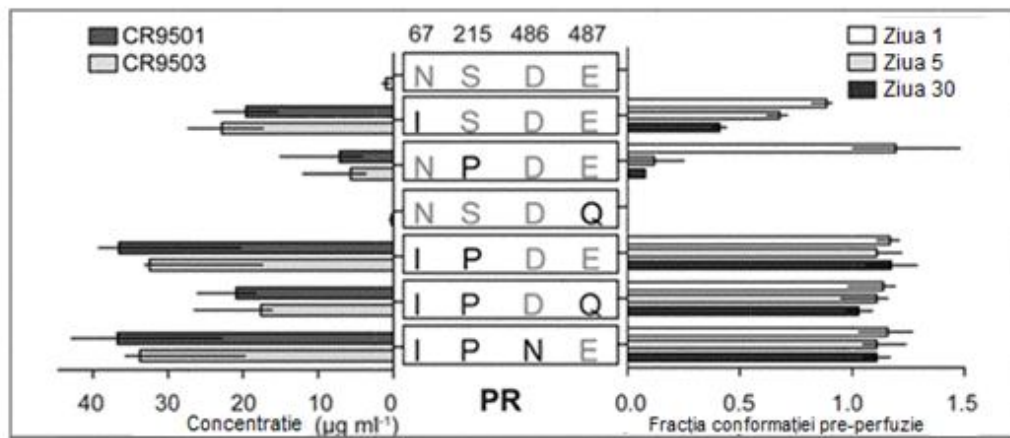


FIG. 2

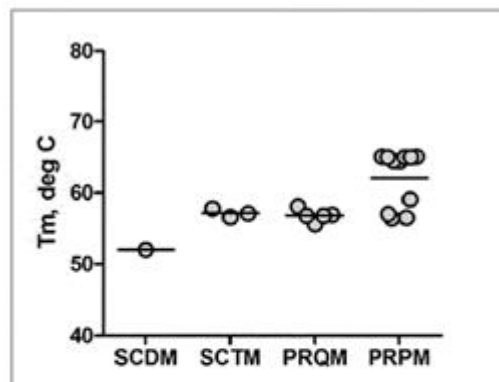


FIG. 3

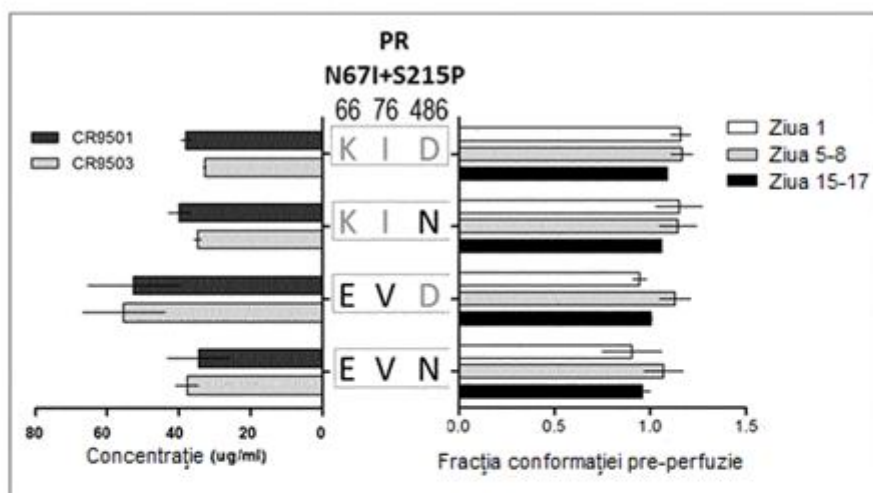


FIG. 4

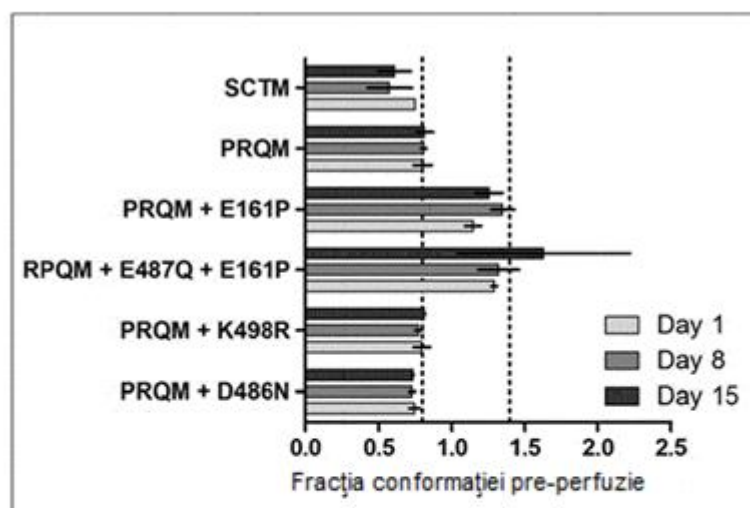


FIG. 5

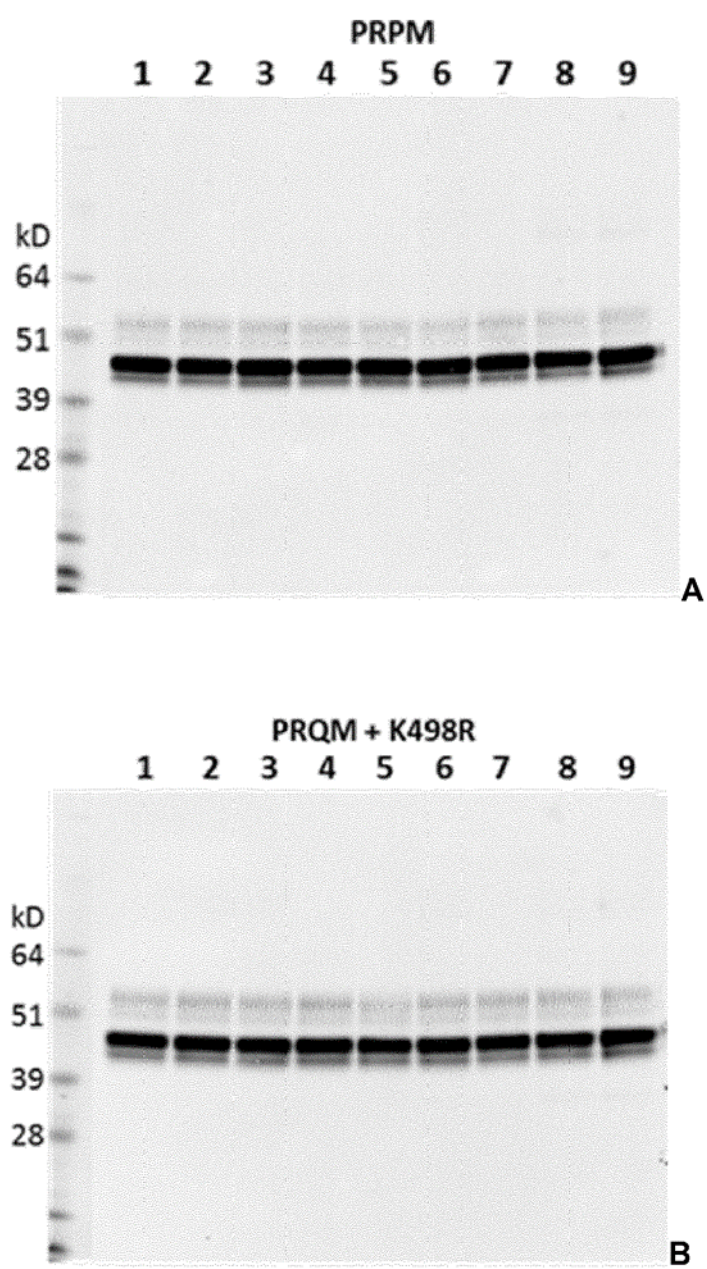


FIG. 6

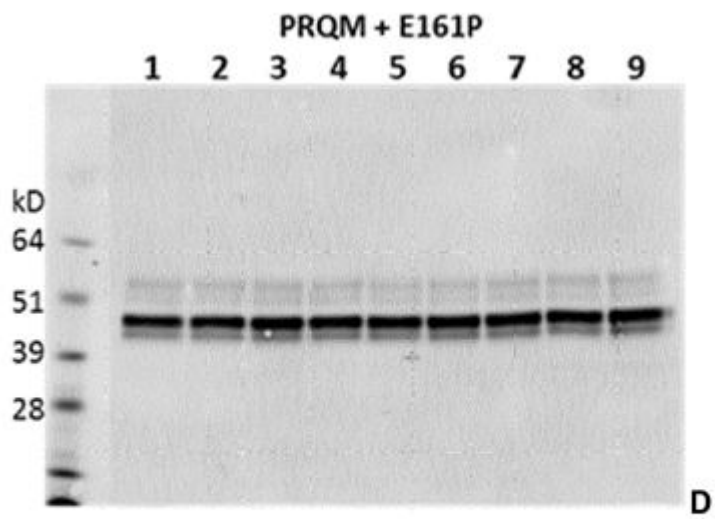
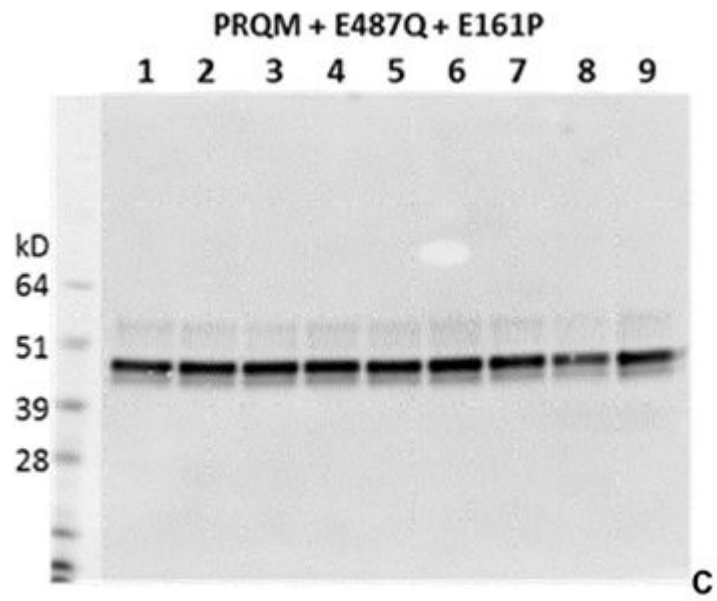


FIG. 6 - continuare

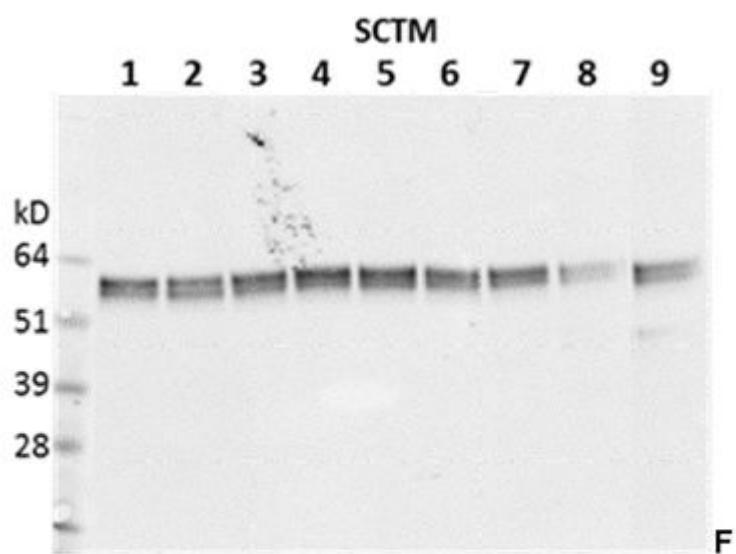
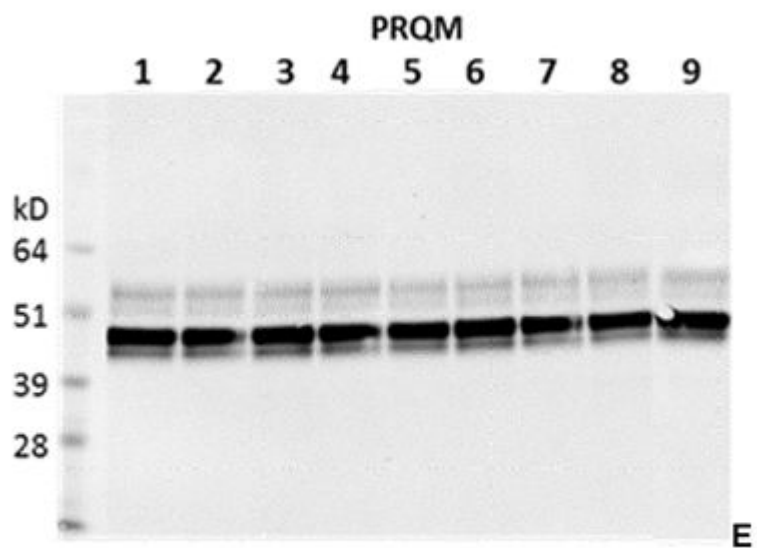


FIG. 6 - continuare

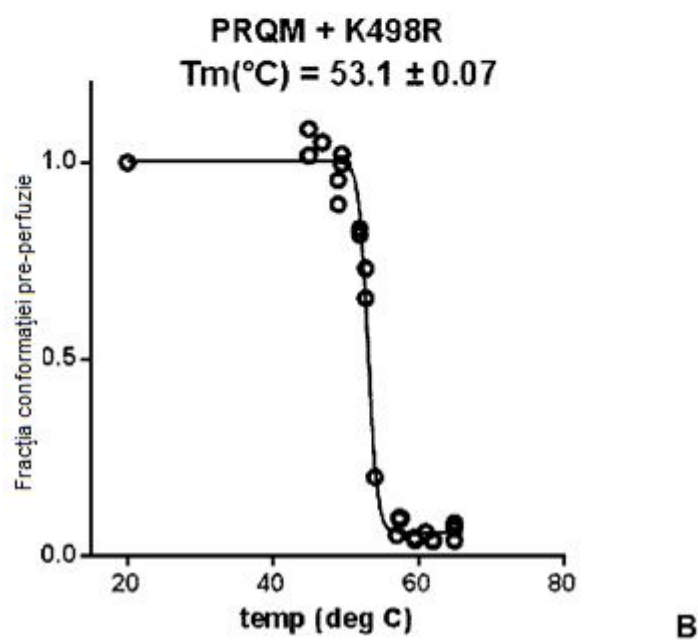
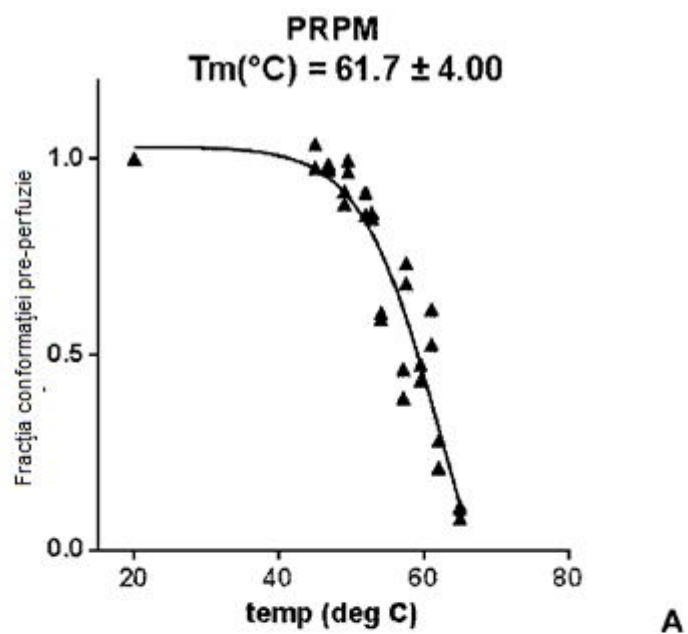


FIG. 7

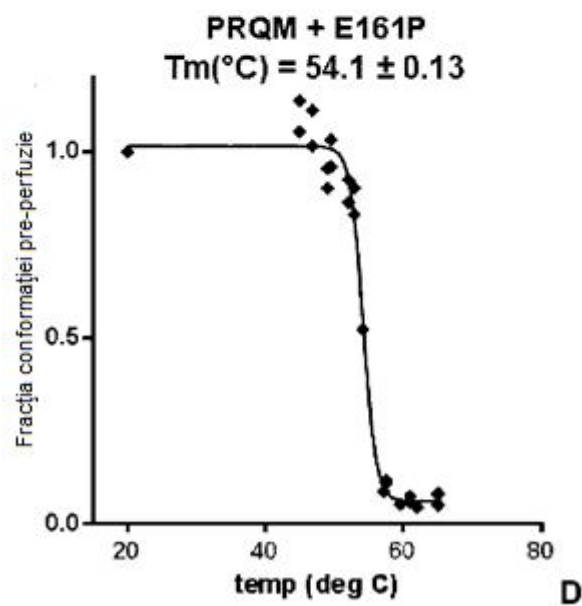
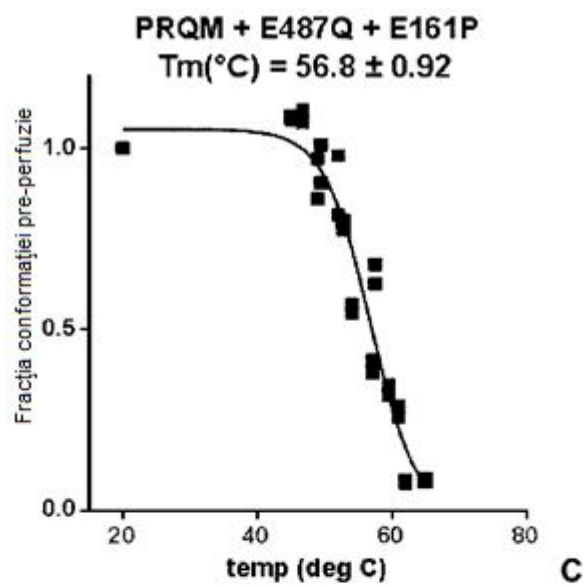


FIG 7. - continuare

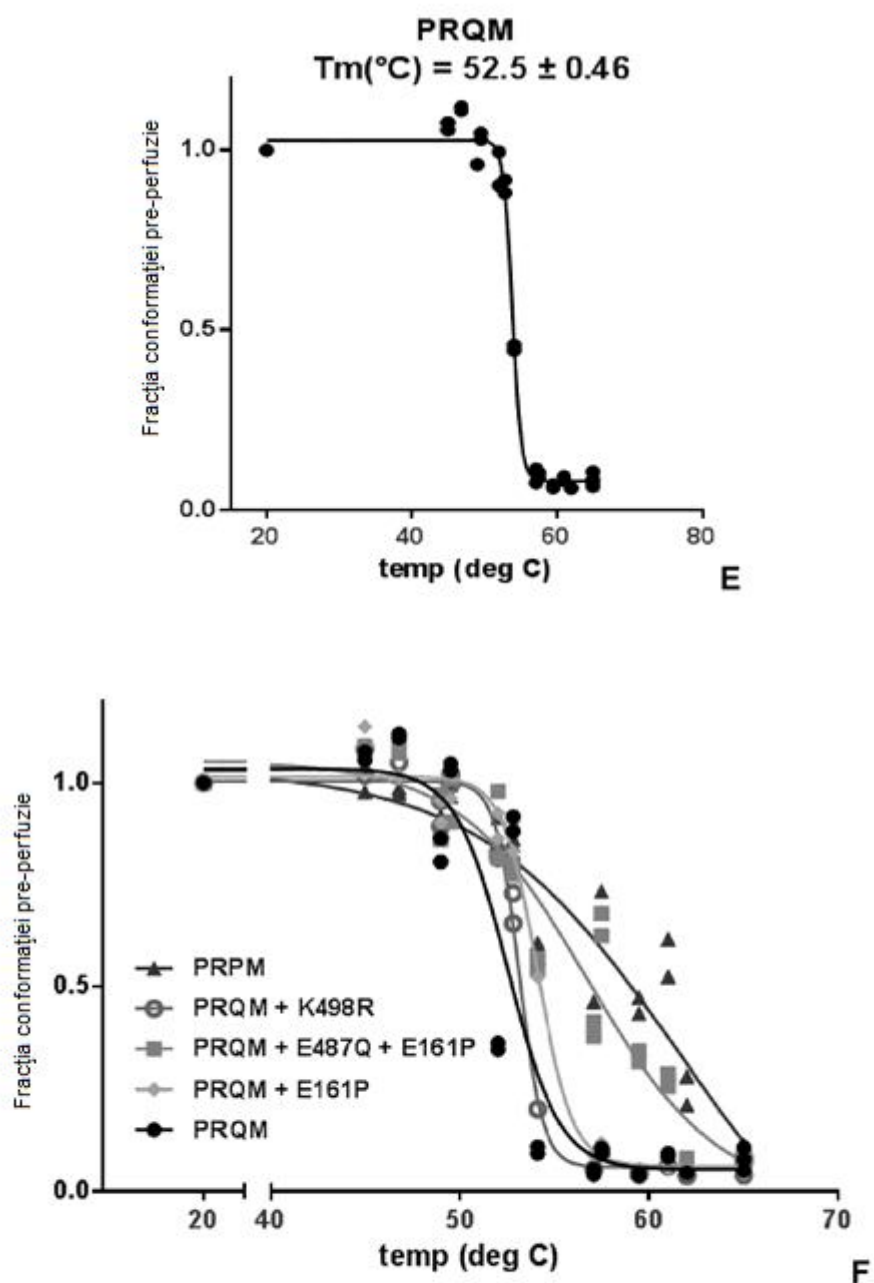


FIG 7. - continuare

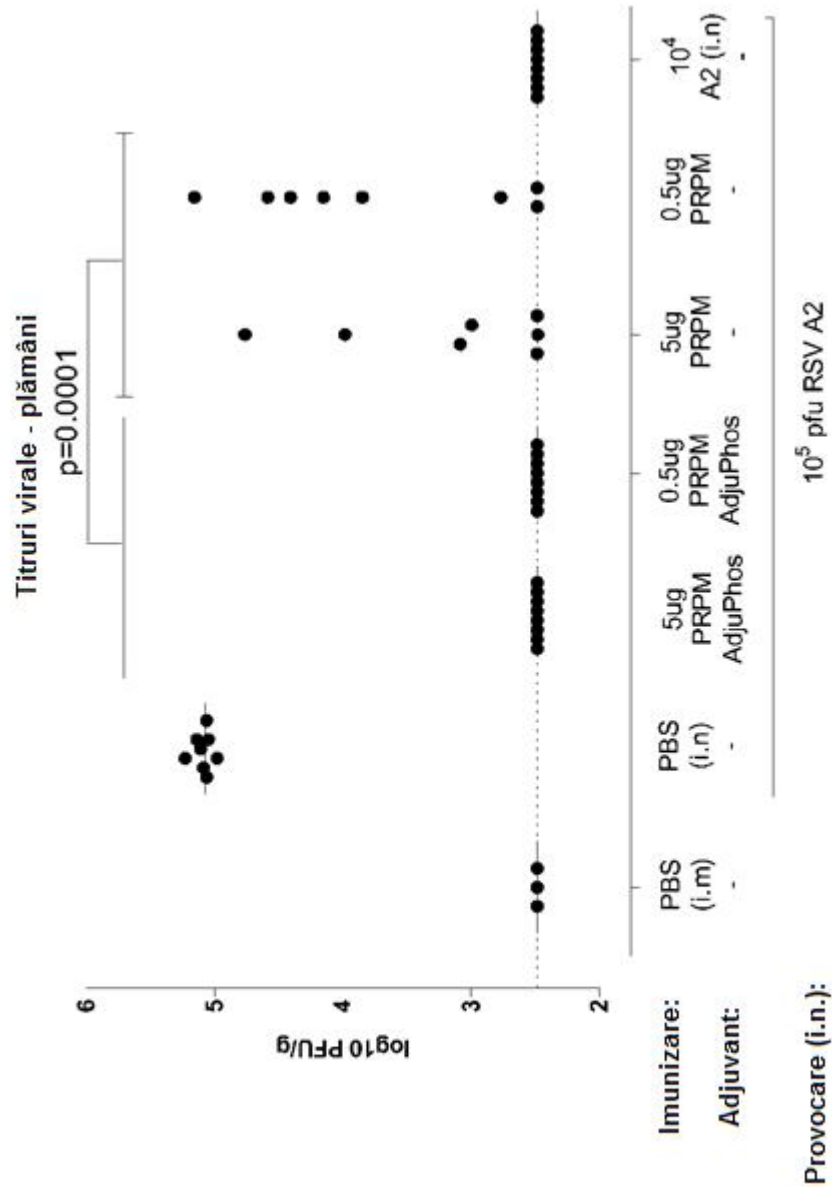


FIG. 8

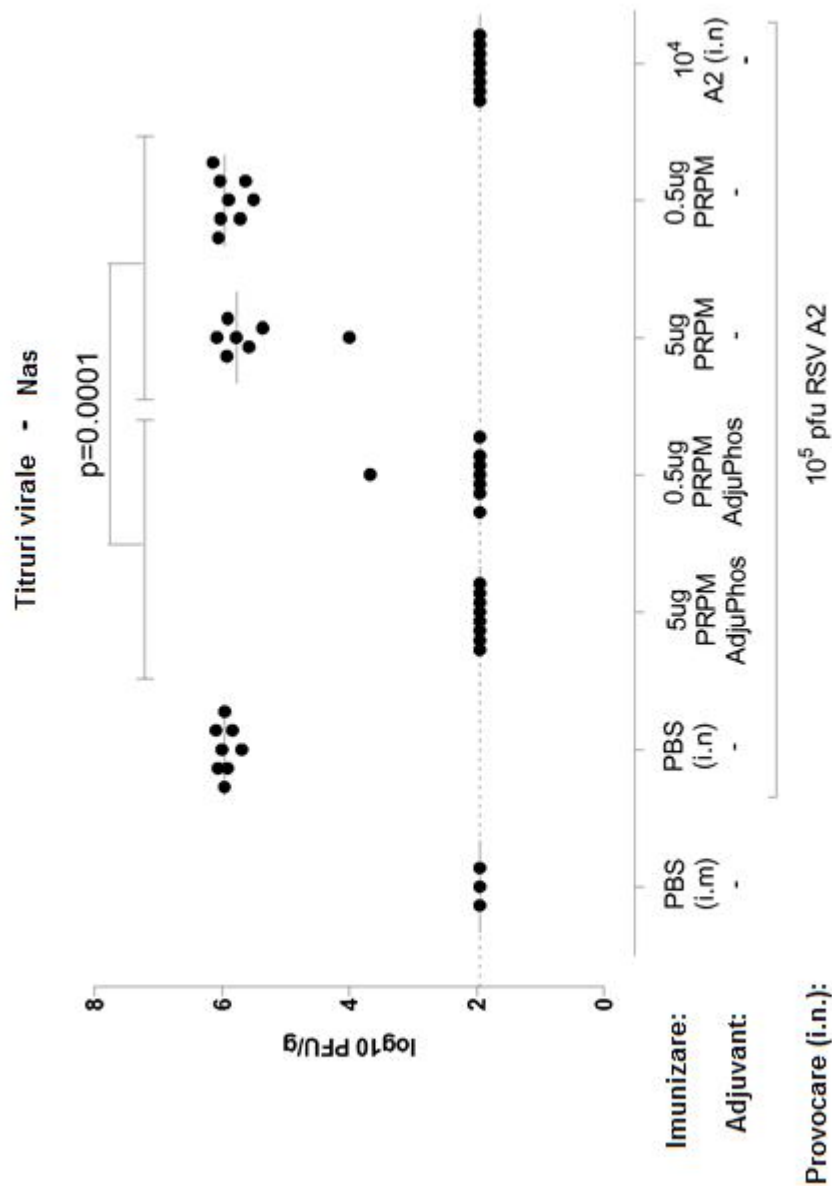


FIG. 8 – continuare

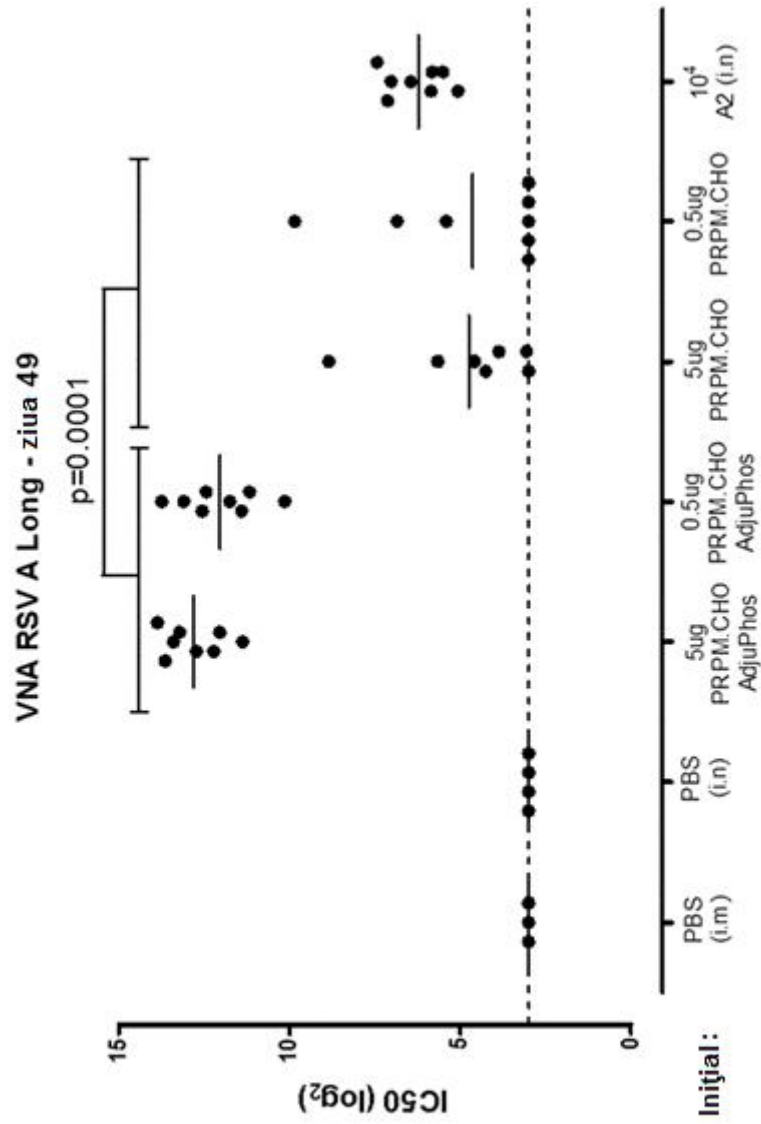


FIG. 9