

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202090326 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.04.28

(51) Int. Cl. A61K 39/12 (2006.01)  
C07K 14/005 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.07.12

---

(54) СТАБИЛИЗИРУЮЩИЕ ТРИМЕР МУТАЦИИ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ HIV

---

(31) 17182075.6; 17191083.9; 18158862.5;  
18178358.0

(32) 2017.07.19; 2017.09.14; 2018.02.27;  
2018.06.18

(33) EP

(86) PCT/EP2018/068900

(87) WO 2019/016062 2019.01.24

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

(72) Изобретатель:  
Лангедейк Йоханнес Петрус Мария,  
Рюттен Люси, Строкаппе Ника  
Минди, Трюан Дафне (NL)

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

(57) Представлены белки оболочки вируса иммунодефицита человека (HIV), имеющие заданные мутации, которые стабилизируют тримерную форму белка оболочки. Белки оболочки HIV, описанные в данном документе, характеризуются увеличенной процентной долей образования тримеров и/или увеличенным выходом тримеров. Также предусмотрены частицы, отображающие белки оболочки HIV, молекулы нуклеиновой кислоты и векторы, кодирующие белки оболочки HIV, а также композиции, содержащие белки оболочки HIV, частицы, нуклеиновую кислоту или векторы.

A1

202090326

202090326

A1

**СТАБИЛИЗИРУЮЩИЕ ТРИМЕР МУТАЦИИ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ HIV****ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Вирус иммунодефицита человека (HIV) поражает миллионы людей по всему миру, и предупреждение HIV с помощью эффективной вакцины по-прежнему имеет первостепенное значение даже в эпоху широкого распространения антиретровирусной терапии. Антигенное разнообразие между различными штаммами и кладами вируса HIV делает сложной разработку вакцин с широким спектром эффективности. HIV-1 представляет собой наиболее распространенный и патогенный штамм вируса, при этом более 90% случаев HIV/AIDS обусловлено инфицированием HIV-1 группы М. Группа М дополнительно подразделяется на клады или подтипы, из которых самой большой является клад С. В идеальном случае эффективная вакцина будет способна вызывать как сильные клеточные ответы, так и выработку нейтрализующих антител широкого спектра действия, способных нейтрализовать штаммы HIV-1 из различных клад.

Шиповидный белок оболочки (Env) на поверхности HIV состоит из тримера гетеродимеров из гликопротеинов gp120 и gp41 (ФИГ. 1А). Белок-предшественник gp160 расщепляется под действием фурина на gp120, который представляет собой головку шипа и содержит сайт связывания рецептора CD4, а также большие гипервариабельные петли (V1-V5), и gp41, который представляет собой заякоренный в мембране стебель шиповидного белка оболочки. Подобно другим фузогенным белкам класса I, gp41 содержит N-концевой пептид слияния (FP), C-концевой трансмембранный (TM) домен и цитоплазматический домен. Для мембранного слияния между мембранами HIV и клетки-мишени необходима серия конформационных изменений белка оболочки. Вакцины против HIV можно разрабатывать на основе белка оболочки.

Однако различные факторы делают разработку вакцины против HIV на основе белка оболочки сложной задачей, в том числе высокая генетическая вариабельность HIV-1, плотное углеводное покрытие белка оболочки и относительно динамическая и лабильная природа структуры шиповидного белка оболочки. Белок оболочки дикого типа является нестабильным вследствие своей функции. Следовательно, иногда в структуру оболочки вводят стабилизирующие модификации для получения вакцин-кандидатов. Белок оболочки представляет собой мишень для нейтрализующих антител, и он характеризуется высокой степенью гликозилирования, что снижает иммуногенность за счет экранирования белковых эпитопов. Все известные нейтрализующие антитела широкого спектра действия (bNAbs) действительно приспособлены к данным гликанам.

Для разработки вакцины предпочтительно применять белки оболочки, которые могут индуцировать выработку bNAb. Однако большинство bNAb распознают только нативную конформацию белка оболочки до того, как он подвергается любым конформационным изменениям. Таким образом, разработка стабильного белка оболочки в его подобной нативной компактной и закрытой конформации, при сведении к минимуму

презентации ненативных и, вследствие этого, не обеспечивающих нейтрализацию эпитопов, могло бы увеличить эффективность выработки таких bNAb. Предыдущие усилия по получению вакцины против HIV были сфокусированы на разработке вакцин, которые содержат эктодомен тримерного белка оболочки HIV, gp140, перед слиянием. У gp140 отсутствует трансмембранный (TM) и цитоплазматический домены, но в отличие от gp120, он может формировать тримерные структуры. Более того, такие предыдущие попытки были сфокусированы, главным образом, на клade A. Однако ширина спектра действия при ответе с нейтрализующим антителом, которое был индуцировано, все еще является ограниченной. Таким образом, также было бы предпочтительно, если были бы доступны стабилизированные тримеры нативного белка оболочки, применимые против нескольких клад HIV.

В течение более чем двух десятилетий предпринимались попытки разработки стабильного белка оболочки в его тримерной конформации перед слиянием, которые привели лишь к ограниченному успеху в получении растворимых стабильных тримеров белка оболочки, способных индуцировать ответ с нейтрализующими антителами широкого спектра действия. Например, для улучшения образования фракции растворимых тримеров gp140 в последовательность белка оболочки были введены так называемые мутации SOSIP (501C, 605C и 559P) (Sanders et al., (2002), J. Virol. 76(17): 8875-89). Так называемые мутации SOSIP включают остатки цистеина в положениях 501 и 605 и остаток пролина в положении 559 согласно нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1, которая представляет собой традиционную схему нумерации, применяемую в данной области техники. Введение двух остатков цистеина в положениях 501 и 605, которые расположены близко друг от друга в трехмерной структуре белка, приводит к образованию дисульфидного мостика. Белки оболочки с мутациями SOSIP, такие как BG505\_SOSIP и B41\_SOSIP (белки оболочки от штаммов BG505 и B41 HIV (т. е. 9032-08.A1.4685) с мутациями SOSIP), применялись в вакцинных исследованиях и, как показано, индуцировали выработку аутологичных нейтрализующих Ab категории 2 (Sanders et al., Science (2015), 349(6224): 139-140).

Однако даже несмотря на то, что так называемые мутации SOSIP способны стабилизировать тримерную форму белка оболочки, фракция тримеров у таких SOSIP-мутантов обычно составляет менее 10%, при этом все еще образуется большое количество мономеров и агрегатов. Даже BG505\_SOSIP с мутациями SOSIP, который представляет собой один из наиболее перспективных, известных в настоящее время белков оболочки с мутациями SOSIP по своей способности стабилизировать тримерную форму, как правило, обеспечивает образование лишь до 25% тримерной формы (Julien et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (2015), 112(38), 11947-52). Более того, в такой тримерной фракции тримеры не являются полностью стабильными, поскольку их составные части неплотно прилегают друг к другу на вершине. Таким образом, для стабилизации вершины и предупреждения неплотного прилегания в дополнение к мутациям SOSIP было разработано несколько дополнительных замен, таких как E64K, A316W и 201C-433C (de Taeye et al., Cell (2015),

163(7), 1702-15; Kwon et al., (2015) Nat. Struct. Mol. Biol. 22(7) 522-31).

Соответственно, существует потребность в стабилизированных тримерах белков оболочки HIV, которые характеризуются увеличенной процентной долей образования тримеров, увеличенным выходом тримеров и/или улучшенной стабильностью тримеров. Предпочтительно такие стабилизированные тримеры белков оболочки HIV также будут демонстрировать хорошее связывание с нейтрализующими антителами широкого спектра действия (bNAb) и относительно ограниченное связывание с нейтрализующими Ab, отличными от антител широкого спектра действия (антитела, отличные от bNAb). Целью настоящего изобретения является обеспечение белков Env HIV, которые характеризуются увеличенными процентными долями тримеров и предпочтительно также увеличенными показателями выхода тримеров.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным белкам оболочки HIV из различных клад, которые характеризуются увеличенной процентной долей образования тримеров и/или увеличенными показателями выхода тримеров по сравнению с ранее описанными тримерами белков оболочки HIV. С помощью мутаций, описанных в данном документе, оптимизируется сворачивание Env, восстанавливаются штаммоспецифические признаки и стабилизируются области закрытой конформации до слияния, важные для процесса слияния. Это обеспечивает универсальный подход для оптимизации сворачивания и стабильности тримеров белков оболочки HIV-1 в закрытой конформации до слияния. Полученные стабильные и надлежащим образом свернутые тримеры Env HIV применимы для целей иммунизации, например, для увеличения вероятности индукции выработки нейтрализующих антител широкого спектра действия и снижения индукции выработки ненейтрализующих и слабых нейтрализующих антител после введения рекомбинантных тримеров Env HIV. Настоящее изобретение также относится к выделенным молекулам нуклеиновой кислоты и векторам, кодирующим рекомбинантные белки оболочки HIV, клеткам, содержащим их, и композициям на основе рекомбинантного белка оболочки HIV, молекулы нуклеиновой кислоты, вектора и/или клеток.

В одном общем аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантным белкам оболочки вируса иммунодефицита человека (HIV), имеющим конкретные аминокислотные остатки в указанных положениях последовательности белка оболочки, обеспечивающие стабилизацию при образовании тримеров.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный белок оболочки (Env) HIV по настоящему изобретению содержит в положении 658 аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Val, Ile, Phe, Met, Ala и Leu, где нумерация положений соответствует нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1. В определенных предпочтительных вариантах осуществления аминокислота в положении 658 представляет собой Val или Ile. В особенно предпочтительном варианте осуществления аминокислота в положении 658 представляет собой Val.



В определенных вариантах осуществления рекомбинантный белок оболочки (Env) HIV по настоящему изобретению дополнительно содержит один или несколько из следующих аминокислотных остатков:

- (i) Phe, Leu, Met или Trp в положении 651;
- (ii) Phe, Ile, Met или Trp в положении 655;
- (iii) Asn или Gln в положении 535;
- (iv) Val, Ile или Ala в положении 589;
- (v) Phe или Trp в положении 573;
- (vi) Ile в положении 204; и/или
- (vii) Phe, Met или Ile в положении 647,

где нумерация положений соответствует нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-

1. В определенных предпочтительных вариантах осуществления указанный аминокислотный остаток в положении 651 представляет собой Phe; указанный аминокислотный остаток в положении 655 представляет собой Ile; указанный аминокислотный остаток в положении 535 представляет собой Asn; и/или указанный аминокислотный остаток в положении 573 представляет собой Phe.

В определенных вариантах осуществления белок Env HIV по настоящему изобретению содержит указанные аминокислотные остатки в по меньшей мере двух из указанных положений, выбранных из группы, состоящей из (i) - (vii) выше.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению содержит Val или Ile в положении 658 и Ile в положении 655. В другом предпочтительном варианте осуществления рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению содержит Val или Ile в положении 658 и Phe в положении 651. В предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению содержит Ile в положении 658 и Ile в положении 655. В других предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению содержит Ile в положении 658 и Phe в положении 651. В других предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению содержит Ile в положении 658, Phe в положении 651 и Ile в положении 655. В особенно предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению содержит Val в положении 658 и Ile в положении 655. В других предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению содержит Val в положении 658 и Phe в положении 651. В определенных предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению содержит Val в положении 658, Phe в положении 651 и Ile в положении 655.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению содержит одну или несколько мутаций, описанных выше, в каркасе консенсусной аминокислотной последовательности Env HIV, например, из клады С (например, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 или 3)

или из клады В (например, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или 5).

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению содержит одну или несколько мутаций, описанных выше, в исходном белке Env HIV, который представляет собой синтетический белок Env HIV, например, содержащий (а): аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, или (b): SEQ ID NO: 6 с мутацией по типу замены Glu на Arg в положении 166, или (с): (а) или (b) с мутацией по типу замены аминокислот в положениях 501 и 605 на остатки Cys и мутацией по типу замены аминокислоты в положении 559 на остаток Pro, или (d): (а), (b) или (с), имеющие дополнительную мутацию сайта расщепления фурином, например, замещение аминокислот в положениях 508-511 на RRRRRR (SEQ ID NO: 10), или (е) SEQ ID NO: 7, или (f) мозаичную последовательность Env, такую как у Env, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или 9.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению содержит одну или несколько мутаций, описанных выше, в исходном белке Env HIV, который предпочтительно представляет собой белок Env HIV дикого типа, предпочтительно из клады С, содержащий по меньшей мере одну восстанавливающую мутацию по аминокислотному остатку, который встречается в соответствующем положении с частотой, составляющей менее 7,5%, предпочтительно менее 2% последовательностей Env HIV в совокупности из по меньшей мере 100, предпочтительно по меньшей мере 1000, предпочтительно по меньшей мере 10000 последовательностей Env HIV дикого типа, где восстанавливающая мутация представляет собой замену на аминокислотный остаток, который встречается в соответствующем положении с частотой, составляющей по меньшей мере 10% последовательностей Env HIV в указанной совокупности, и предпочтительно восстанавливающая мутация представляет собой замену на аминокислотный остаток, который наиболее часто встречается в соответствующем положении в указанной совокупности.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления Env HIV содержит Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu, предпочтительно Val, в положении 658, и аминокислотный остаток в положении 651 представляет собой Phe; аминокислотный остаток в положении 655 представляет собой Ile; аминокислотный остаток в положении 535 представляет собой Asn; и/или аминокислотный остаток в положении 573 представляет собой Phe.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV согласно настоящему изобретению получен из HIV клады С.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV согласно настоящему изобретению содержит консенсусную последовательность Env HIV. В определенных вариантах ее осуществления консенсусная последовательность представляет собой консенсусную последовательность Env HIV клады С. В других вариантах осуществления консенсус представляет собой консенсусную последовательность Env HIV клады В. В других вариантах осуществления консенсус

представляет собой консенсусную последовательность Env HIV клда А.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению содержит одну или несколько мутаций, описанных выше, и дополнительно содержит Cys в положениях 501 и 605, или Pro в положении 559, или предпочтительно Cys в положениях 501 и 605 и Pro в положении 559 (так называемый 'SOSIP'-вариант белка Env HIV), где нумерация положений соответствует нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления аминокислотный остаток в положении 658 представляет собой Val; аминокислотный остаток в положении 651 представляет собой Phe; аминокислотный остаток в положении 655 представляет собой Ile; аминокислотный остаток в положении 535 представляет собой Asn; и аминокислотный остаток в положении 573 представляет собой Phe.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению дополнительно содержит один или несколько из следующих аминокислотных остатков:

(viii) Gln, Glu, Ile, Met, Val, Trp или Phe, предпочтительно Gln или Glu, в положении 588;

(ix) Lys в положении 64, или Arg в положении 66, или Lys в положении 64 и Arg в положении 66;

(x) Trp в положении 316;

(xi) Cys в обоих из положений 201 и 433;

(xii) Pro в положении 556, или Pro в положении 558, или Pro в положениях 556 и 558; (xiii) замещение петли в аминокислотных положениях 548-568 (HR1-петля) петель, имеющей 7-10 аминокислот, предпочтительно петель из 8 аминокислот, например, имеющей последовательность, выбранную из любой из (SEQ ID NO: 12-17);

(xiv) Gly в положении 568, или Gly в положении 569, или Gly в положении 636, или Gly в обоих из положений 568 и 636, или Gly в обоих из положений 569 и 636; и/или

(xv) Tyr в положении 302, или Arg в положении 519, или Arg в положении 520, или Tyr в положении 302 и Arg в положении 519, или Tyr в положении 302 и Arg в положении 520, или Tyr в положении 302 и Arg в обоих из положений 519 и 520.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению дополнительно содержит мутацию в последовательности расщепления фурином белка Env HIV, такую как замещение в положениях 508-511 на RRRRRR (SEQ ID NO: 10).

В одном варианте осуществления рекомбинантный белок Env HIV представляет собой белок gp140.

В другом варианте осуществления рекомбинантный белок Env HIV представляет собой белок gp160.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV усечен в цитоплазматической области, например, после 7 аминокислот цитоплазматической

области.

Также раскрыт способ улучшения сворачивания и стабильности (измеряемых как повышенные процентная доля тримеров и/или выход тримеров) исходного белка Env HIV, причем способ предусматривает восстановление аминокислотной последовательности исходного белка Env HIV путем введения по меньшей мере одной восстанавливающей мутации, предпочтительно по меньшей мере 3 восстанавливающих мутаций в исходный белок Env HIV, где восстанавливающая мутация представляет собой аминокислотную замену аминокислотного остатка, который присутствует в соответствующем положении с частотой, составляющей менее 7,5%, предпочтительно менее 2% последовательностей Env HIV в совокупности из по меньшей мере 100, предпочтительно по меньшей мере 500, предпочтительно по меньшей мере 1000, предпочтительно по меньшей мере 10000 последовательностей Env HIV дикого типа, где замена представляет собой замену на аминокислотный остаток, который присутствует в соответствующем положении с частотой, составляющей по меньшей мере 10% последовательностей Env HIV в указанной совокупности, и предпочтительно замена представляет собой замену на аминокислотный остаток, который наиболее часто присутствует в соответствующем положении в указанной совокупности. Также раскрыт восстановленный белок Env HIV, который можно получать с помощью указанного способа для улучшения сворачивания и стабильности (измеряемых как повышение процентной доли тримеров и/или выхода тримеров) белка Env HIV. Также раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая указанный восстановленный белок Env HIV. Также раскрыт способ получения белка Env HIV, предусматривающий способ восстановления белка Env HIV, описанного в данном документе, и экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей восстановленный стабилизированный белок Env HIV, в рекомбинантной клетке-хозяине.

Также раскрыт рекомбинантный белок Env HIV, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 2, где положение 658, предпочтительно положения 204, 535, 573, 589, 647, 651 и 655, и предпочтительно дополнительные положения 64, 66, 201, 316, 433, 501, 508-511, 556, 558, 559, 588, 548-568 и 605 не принимают во внимание при определении % идентичности, где аминокислота в положении 658 представляет собой Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu, предпочтительно Val, и где нумерация соответствует нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1. В его определенных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 3, где положение 658, предпочтительно положения 204, 535, 573, 589, 647, 651 и 655, и предпочтительно дополнительные положения 64, 66, 201, 316, 433, 508-511, 556, 558, 588 и 548-568 не принимают во внимание при определении % идентичности, где аминокислота в положении 658 представляет собой Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu, предпочтительно Val, и где нумерация соответствует нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1.

В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному

белку Env HIV, содержащему аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 4, где положение 658, предпочтительно положения 204, 535, 573, 589, 647, 651 и 655, и предпочтительно дополнительные положения 64, 66, 201, 316, 433, 501, 508-511, 556, 558, 559, 588, 548-568 и 605 не принимают во внимание при определении % идентичности, где аминокислота в положении 658 представляет собой Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu, предпочтительно Val, и где нумерация соответствует нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1. В его определенных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 5, где положение 658, предпочтительно положения 204, 535, 573, 589, 647, 651 и 655, и предпочтительно дополнительные положения 64, 66, 201, 316, 433, 508-511, 556, 558, 588 и 548-568 не принимают во внимание при определении % идентичности, где аминокислота в положении 658 представляет собой Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu, предпочтительно Val, и где нумерация соответствует нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1.

В данных аспектах и вариантах осуществления одна или несколько из аминокислот в указанных положениях, которые не принимают во внимание при определении % идентичности, предпочтительно выбраны из аминокислот, указанных как предпочтительные в данном документе, например, Ile в положении 204; Phe, Ala, Leu или Trp в положении 651 и т. д. (см. таблицы 1 и 2 ниже).

Также раскрыт рекомбинантный белок Env HIV, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 20, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32, где SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32 являются особенно предпочтительными, и где аминокислота в положении 658 представляет собой Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu, предпочтительно Val. В данном аспекте предпочтительно положения 204, 535, 573, 589, 647, 651, 655 и 658, и предпочтительно дополнительные положения 64, 66, 201, 316, 433, 508-511, 556, 558, 588 и 548-568 не принимают во внимание при определении % идентичности, и где нумерация соответствует нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1. Также в данном аспекте одна или несколько из аминокислот в указанных положениях, которые не принимают во внимание при определении % идентичности, предпочтительно выбраны из аминокислот, указанных как предпочтительные в данном документе в (i) - (vii) из таблицы 1, (viii) - (xv) из таблицы 2 и/или (xvi) из таблицы 1, например, Ile в положении 204; Phe, Leu, Met или Trp в положении 651 и т. д.

В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к тримерному комплексу, содержащему нековалентный олигомер из трех любых рекомбинантных белков Env HIV, описанных в данном документе.

В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к частице, например, липосоме или наночастице, например, самособирающейся наночастице, имеющей на своей поверхности рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению.

В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению, и векторам, содержащим выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, функционально связанную с промотором. В одном варианте осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В другом варианте осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии. В одном предпочтительном варианте осуществления вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор.

Другой общий аспект относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, кодирующие рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению. Такие клетки-хозяева можно применять для получения рекомбинантного белка, экспрессии рекомбинантного белка или получения вирусных частиц.

Другой общий аспект относится к способам получения рекомбинантного белка Env HIV, предусматривающим выращивание клетки-хозяина, содержащей выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, кодирующие рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению, в условиях, подходящих для получения рекомбинантного белка Env HIV.

Еще один общий аспект относится к композиции, содержащей рекомбинантный белок Env HIV, тримерный комплекс, выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к способу улучшения образования тримеров белка Env HIV, при этом способ предусматривает введение замены аминокислоты (например, Lys) в положении 658 на Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu, предпочтительно на Val, в исходном белке Env HIV, где нумерация положений соответствует нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Вышеизложенное краткое описание, а также нижеследующее подробное описание настоящего изобретения будут более понятны при их рассмотрении в сочетании с прилагаемыми графическими материалами. Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, показанными на графических материалах.

На фигурах представлено следующее.

На ФИГ. 1А и 1В показано схематическое изображение структуры белков оболочки (Env) HIV.

На ФИГ. 1А показан полноразмерный белок Env HIV; и

на ФИГ. 1В показан растворимый белок Env HIV, содержащий так называемые мутации SOSIP и С-концевое усечение, начинающееся в остатке 664 согласно нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1 (последовательность SOSIP.644).

На ФИГ. 2А и 2В показаны процентная доля образования тримеров (ФИГ. 2А) и выход тримеров (ФИГ. 2В) в случае рекомбинантных белков Env HIV с определенными

мутациями, измеряемые с помощью анализа AlphaLISA, описанного в примере 3; тестируемые рекомбинантные белки Env HIV содержали одиночную, двойную или тройную аминокислотную замену, введенную в каркасную консенсусную последовательность Env HIV кланды C, ConC\_SOSIP (SEQ ID NO: 3); процентную долю тримеров и выход тримеров определяли на основе связывания специфического в отношении тримера моноклонального антитела (mAb), PGT145, с каждым из рекомбинантных белков Env HIV; выход тримеров и процентную долю образования тримеров для каждого из рекомбинантных белков Env HIV по настоящему изобретению сравнивают с образованием тримеров в случае белка оболочки, имеющего каркасную последовательность ConC\_SOSIP без каких-либо дополнительных стабилизирующих тример мутаций, описанных в данном документе.

На ФИГ. 3 показаны хроматограммы, полученные с помощью анализа эксклюзионной хроматографии в сочетании с многоугловым светорассеянием (SEC-MALS) рекомбинантных белков Env HIV с определенными мутациями; тестируемые рекомбинантные белки Env HIV содержали одиночную аминокислотную замену, введенную в каркасную консенсусную последовательность Env HIV кланды C, ConC\_SOSIP (SEQ ID NO: 3), и их очищали с помощью афинной хроматографии с применением лектина, как описано в примере 2; анализ SEC-MALS проводили, как описано в примере 3; пик, соответствующий тримерной форме, указан на каждой из хроматограмм.

На ФИГ. 4А-4В показаны процентная доля образования тримеров (фиг. 4А) и выход тримеров (фиг. 4В) для рекомбинантных белков Env HIV, имеющих одиночную аминокислотную замену, введенную в каркасную консенсусную последовательность Env HIV кланды B, ConB\_SOSIP (SEQ ID NO: 5) с определенными мутациями, в сравнении с таковыми в случае белка оболочки, имеющего каркасную последовательность ConB\_SOSIP без каких-либо дополнительных стабилизирующих тример мутаций, описываемых в примере 4; выход тримеров и процентную долю образования тримеров измеряли с помощью анализа AlphaLISA.

На ФИГ. 5А-5В показаны процентная доля образования тримеров и выход тримеров в случае рекомбинантных белков Env HIV, имеющих аминокислотные замены, введенные в каркасную последовательность синтетического белка оболочки HIV, DS\_sC4\_SOSIP\_E166R, как описано в примере 5; процентную долю образования тримеров и выход тримеров измеряли с помощью анализа AlphaLISA.

На ФИГ. 6 показаны хроматограммы, полученные с помощью анализа эксклюзионной хроматографии в сочетании с многоугловым светорассеянием (SEC-MALS) рекомбинантных белков Env HIV с определенными мутациями; тестируемые рекомбинантные белки Env HIV содержали одиночную мутацию K655I, при этом в каждом следующем варианте вводилась дополнительная мутация в каркасную консенсусную последовательность Env HIV кланды C, ConC\_SOSIP (SEQ ID NO: 3), и их очищали с помощью афинной хроматографии с применением лектина, как описано в

примере 2; анализ SEC-MALS проводили, как описано в примере 3; пик, соответствующий мономерам gp140 в ConC\_SOSIP, указан затемненной рамкой справа от пика тримеров. На нижней панели показано увеличение нижней части графика, вследствие чего можно увидеть, что каждая дополнительная мутация приводит к дополнительному снижению высоты пика мономеров gp140.

На ФИГ. 7A-7D показаны процентная доля образования тримеров (ФИГ. 7A, B для различных экспериментов) и выход тримеров (ФИГ. 7C, D для различных экспериментов) в случае рекомбинантных белков Env HIV с указанными мутациями, описываемыми в примере 8, как измерено с помощью анализа AlphaLISA.

На ФИГ. 8 показаны хроматограммы SEC-MALS рекомбинантных белков Env HIV с указанными мутациями, описываемыми в примере 8.

На ФИГ. 9A-9B показаны процентная доля образования тримеров (фиг. 9A) и выход тримеров (фиг. 9B) в случае BG505\_SOSIP (происходящего из штамма клады A дикого типа), имеющего одиночные аминокислотные замены и комбинации замен, по сравнению с таковыми в случае белка оболочки, имеющего каркасную последовательность BG505\_SOSIP без каких-либо дополнительных стабилизирующих тример мутаций, описанных в примере 9. Выход тримеров и процентную долю образования тримеров измеряли с помощью анализа AlphaLISA.

На ФИГ. 10 показаны хроматограммы, полученные с помощью анализа эксклюзионной хроматографии в сочетании с многоугловым светорассеянием (SEC-MALS) рекомбинантных белков Env HIV; анализ SEC-MALS проводили в отношении супернантанта культуры клеток, трансфицированных Env. Пик, соответствующий тримерной форме, элюируется от 7 до 7,5 минуты. Темно-серая линия представляет собой BG505\_SOSIP (происходящий из штамма клады A дикого типа), а светло-серая линия представляет собой BG505\_SOSIP с заменами L556P, K655I, M535N, N651F, D589V, K588E.

На ФИГ. 11A-11B показан выход тримеров в случае вариантов C97ZA\_SOSIP, описанных в примере 10. Выход тримеров C97ZA с тремя стабилизирующими заменами (L556P, T651F и M535N) (фиг. 10A и B). На фигуре 11B последовательность Env дополнительно оптимизировали за счет дополнительных мутаций (21 дополнительная мутация), которые добавляли для восстановления последовательности Env C97ZA согласно концептуальному остову, описанному на ФИГ. 13, и за счет введения дополнительных стабилизирующих замен (K655I, D589V, A204I и K588E). Выход тримеров и процентную долю образования тримеров измеряли с помощью анализа AlphaLISA. Сигналы нормализовали относительно сигнала ConC\_SOSIP, который установили как 1. PNGS представляет собой потенциальный сайт N-гликозилирования.

ФИГ. 12. Выход тримеров Env HIV-1 штамма DU422 с четырьмя стабилизирующими заменами (см. подробности в примере 11). Все значения нормализовали относительно значения ConC\_SOSIP (не показано), которое считали равным 1.



ФИГ. 13. Универсальная концепция восстановления последовательности Env HIV-1, проиллюстрированная для штамма C97ZA. Остаток с наибольшей частотой встречаемости (называемый в данном документе 'консенсусный остаток') в общей базе данных HIV-1 (верхние столбики) и остаток в штамме C97ZA (нижние столбики) отсортированы от низкой к высокой процентной доле встречаемости положения остатка в C97ZA. Положения в последовательности C97ZA, которые следует заменить на консенсусный остаток, отбирали на основе следующих критериев. Положения остатка в C97ZA, которые встречаются в менее 2% последовательностей из базы данных Env (черные столбики). Положения остатка в C97ZA, которые встречаются в 2% - 7,5% последовательностей из базы данных Env и являются погруженными или частично погруженными (темно-серые столбики). Положения, которые являются доступными и гидрофобными в C97ZA, и гидрофильные консенсусные остатки (два самых светло-серых столбика), и положение, которое представляет собой консенсусный остаток (S234N) потенциального сайта N-гликозилирования (PNGS).

ФИГ. 14. Тримеры Env\_SOSIP HIV в закрытой конформации до слияния, полученные посредством восстановления последовательности и мутационной стабилизации. Сигналы AlphaLISA для всех вариантов SOSIP, полученные с помощью супернатанта культуры клеток, нормализованные относительно ConC\_SOSIP, в случае применения нейтрализующих антител широкого спектра действия. В случае соответствующих вариантов Env HIV "стабилизированный" указан как 'STAB' и "восстановленный" указан как 'REP'.

ФИГ. 15. Аналитический профиль SEC контрольных вариантов Env\_SOSIP (каркасная последовательность SOSIP), вариантов Env, восстановленных согласно концепции, описанной в примере 12 и на ФИГ. 13, и вариантов Env с дополнительными стабилизирующими заменами согласно таблице 3, с применением супернатантов культур клеток после трансфекции. Ложный сигнал супернатанта культуры клеток вычитали из всех профилей. Пики тримеров указаны как \*.

ФИГ. 16. Выход тримеров вариантов ConC Env HIV-1 без стабилизирующих модификаций SOSIP.

ФИГ. 17. Выход тримеров (A) и процентная доля тримеров (B) ConC\_SOSIP с мутациями по типу замены на метионин в положениях 589, 647, 651 и 655. Все значения нормализовали относительно значения ConC\_SOSIP (не показано), которое считали равным 1. Планка погрешностей показана на правом конце столбиков.

ФИГ. 18. Аналитические профили SEC ConB\_SOSIP и ConB\_SOSIP\_Q658V с применением супернатантов культуры клеток после трансфекции. Ложный сигнал супернатанта культуры клеток вычитали из всех профилей. Пики тримеров указаны с помощью линии и помечены как тример, а пик мономеров помечен как мономер.

ФИГ. 19. Титры ID50 в сыворотке крови у кроликов. Титры ID50 в сыворотке крови у кроликов (одно животное на линию на тепловой карте) после примирования с помощью липосом ConC\_SOSIP Ni-NTA (стабилизированный ConC\_SOSIP.v3, SEQ ID

NO: 28) и 3 бустерных иммунизаций с помощью белков Env (восстановленные и стабилизированные (RAS) sC4\_SOSIP.v4, SEQ ID NO: 32; RAS C97ZA\_SOSIP.v2, SEQ ID NO: 30; RAS Du422\_SOSIP.v1, SEQ ID NO: 31), ковалентно связанных с липосомами (Env-липосомы), как описано в примере 15. Контрольным животным (n=2) инъекцировали Tris-буфер. Применение панели из 7 вирусов категории 2 клады C (код для колонок в тепловой карте с применением изолята Env клады C внизу).

ФИГ. 20. Эффект стабилизирующих мутаций на мембраносвязанный консенсусный C SOSIP Env. Эксперимент FACS, в котором сравнивают интегрированное значение MFI мембраносвязанного ConC\_SOSIP\_FL со стабилизированным ConC\_SOSIP\_FL. Данные нанесены на график в виде среднего кратного изменения относительно каркаса ConC\_SOSIP\_FL  $\pm$  SD (двойное окрашивание). Подробности см. в примере 18.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Различные публикации, статьи и патенты цитируются или описываются в разделе "Предпосылки изобретения" и на протяжении всего описания; при этом каждый из этих литературных источников включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которое было включено в настоящее описание, предназначено для обеспечения контекста настоящего изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что любые или все из этих материалов являются частью предшествующего уровня техники относительно любых раскрытых или заявленных изобретений.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимает средний специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В иных случаях определенные термины, используемые в данном документе, имеют значения, изложенные в описании. Все патенты, опубликованные заявки на патент и публикации, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены в данном документе. Следует отметить, что используемые в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в данном документе, во всех случаях следует понимать как модифицированные термином "приблизительно". Таким образом, числовое значение обычно включает  $\pm$  10% от указанного значения. Как используется в данном документе, применение числового интервала однозначно включает все возможные подынтервалы, все индивидуальные числовые значения в пределах этого интервала, включая целые числа в пределах таких интервалов и дробные значения, если в контексте явно не указано иное.

Аминокислоты упоминаются на протяжении всего настоящего раскрытия. Существует двадцать встречающихся в природе аминокислот, а также множество не встречающихся в природе аминокислот. Каждая известная аминокислота, в том числе как

природные, так и неприродные аминокислоты, имеет полное название, сокращенный однобуквенный код и сокращенный трехбуквенный код, все из которых хорошо известны средним специалистам в данной области. Например, для двадцати встречающихся в природе аминокислот применяются следующие трех- и однобуквенные сокращенные коды: аланин (Ala; A), аргинин (Arg; R), аспарагиновая кислота (Asp; D), аспарагин (Asn; N), цистеин (Cys; C), глицин (Gly; G), глутаминовая кислота (Glu; E), глутамин (Gln; Q), гистидин (His; H), изолейцин (Ile; I), лейцин (Leu; L), лизин (Lys; K), метионин (Met; M), фенилаланин (Phe; F), пролин (Pro; P), серин (Ser; S), треонин (Thr; T), триптофан (Trp; W), тирозин (Tyr; Y) и валин (Val; V). Аминокислоты могут обозначаться с помощью своего полного названия, однобуквенного сокращенного кода или трехбуквенного сокращенного кода.

Если из контекста явным образом не следует иное, нумерация положений в аминокислотной последовательности белка оболочки HIV, используемая в данном документе, соответствует нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1, например, как изложено в Korber et al. (Human Retroviruses and AIDS 1998: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. Korber et al., Eds. Theoretical Biology и Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N. Mex.), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Нумерация согласно HXB2 является общепринятой в области белков Env HIV. gp160 из изолята HXB2 HIV-1 имеет аминокислотную последовательность, показанную под SEQ ID NO: 1. Выравнивание представляющей интерес последовательности Env HIV с данной последовательностью можно применять для поиска соответствующей нумерации аминокислот в представляющей интерес последовательности.

Термин "процент (%) идентичности последовательностей" или "% идентичности" описывает число совпадений ("хитов") идентичных аминокислот в двух или более выровненных аминокислотных последовательностях относительно числа аминокислотных остатков, составляющих общую длину аминокислотных последовательностей. Другими словами, применяя выравнивание в отношении двух или более последовательностей, можно определять процентную долю аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми (например, 95%, 97% или 98% идентичности), когда последовательности сравнивают и выравнивают для максимального соответствия, измеряемого с применением алгоритма сравнения последовательностей, известного из уровня техники, или когда их выравнивают вручную и проверяют визуально. Таким образом, последовательности, которые сравнивают для определения идентичности последовательностей, могут отличаться заменой(ами), добавлением(ями) или делецией(ями) аминокислот. Подходящие программы для выравнивания белковых последовательностей известны специалистам в данной области. Процент идентичности последовательностей у белковых последовательностей можно определять, например, с помощью программ, таких как CLUSTALW, Clustal Omega, FASTA или BLAST, например, с применением алгоритма NCBI BLAST (Altschul SF, et al (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402).

Используемая в данном документе 'совокупность последовательностей Env HIV' представляет собой совокупность из типичного числа (например, по меньшей мере 100, или 500, или 1000, или более) случайных последовательностей белка Env HIV дикого типа, которые могут быть из одной клады (например, из клады C) или из разных клад (например, из клад A, B, C и т. д.). Подходящие совокупности таких последовательностей доступны в базах данных, например, в базе данных последовательностей HIV (Национальная лаборатория Лос-Аламоса), или из них можно извлекать совокупности меньшего размера. Такая совокупность содержит предпочтительно по меньшей мере 100 последовательностей белка Env HIV, 1000 последовательностей белка Env HIV, по меньшей мере 10000 последовательностей белка Env HIV, по меньшей мере 50000 последовательностей белка Env HIV и может содержать более чем 90000 последовательностей белка Env HIV.

'Соответствующее положение' в белке Env HIV относится к положению аминокислотного остатка, когда подвергнуты выравниванию по меньшей мере две последовательности Env HIV. Если не указано иное, нумерация положения аминокислоты для этих целей соответствует нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1, как принято в данной области техники.

Используемая в данном документе 'стабилизирующая мутация' представляет собой мутацию, описанную в данном документе в любом из пунктов (i) - (vii) или (xvi) таблицы 1 или (viii) - (xv) таблицы 2, которая обеспечивает увеличение процентной доли тримеров и/или выхода тримеров (что можно измерять, например, согласно анализам AlphaLISA или SEC-MALS, описанным в данном документе) белка Env HIV по сравнению с исходной молекулой, если мутация введена посредством замены соответствующей аминокислоты в указанной исходной молекуле. Аминокислоты, образующиеся за счет таких стабилизирующих мутаций, как правило, редко или совсем не встречаются в белках Env изолятов HIV дикого типа.

Используемая в данном документе 'восстанавливающая мутация' представляет собой замену аминокислотного остатка в исходном белке Env HIV, если аминокислотный остаток присутствует в менее 7,5%, предпочтительно менее 2% случаев в соответствующем положении в совокупности последовательностей белка Env HIV, где замена представляет собой замену на аминокислоту, которая присутствует в соответствующем положении в указанной совокупности более часто, например, у по меньшей мере 10% белков Env HIV в указанной совокупности, и предпочтительно представляет собой замену на аминокислоту, которая присутствует в соответствующем положении у по меньшей мере 20% белков Env HIV указанной совокупности, или которая представляет собой наиболее часто встречающуюся аминокислоту в соответствующем положении в указанной совокупности. Таким образом, аминокислоты, образующиеся за счет таких восстанавливающих мутаций, как правило, встречаются у относительно высокой процентной доли белков Env из изолятов HIV дикого типа, и в нескольких случаях они могут совпадать с аминокислотами, находящимися в соответствующем

положении в консенсусных последовательностях Env HIV.

Используемая в данном документе 'восстановленная и стабилизированная' последовательность Env HIV, как правило, содержит по меньшей мере одну восстанавливающую мутацию и по меньшей мере одну стабилизирующую мутацию, предпочтительно несколько восстанавливающих мутаций и несколько стабилизирующих мутаций по сравнению с исходной последовательностью Env HIV.

Термины 'природный' или 'дикого типа' используются в данном документе взаимозаменяемо при обозначении штаммов HIV (или белков Env из них), и они относятся к штаммам HIV (или белкам Env из них), встречающимся в природе, например, таким как у инфицированных HIV пациентов.

Настоящее изобретение в целом относится к рекомбинантным белкам оболочки (Env) HIV, содержащим определенные аминокислотные замены в указанных положениях последовательности белка оболочки, которые стабилизируют тримерную форму белка оболочки. Введение одной или нескольких из указанных аминокислотных замен по настоящему изобретению в последовательность белка оболочки HIV может приводить к повышенной процентной доле образования тримеров и/или повышенному выходу тримеров. Их можно измерять, например, с применением тримерспецифических антител, температуры плавления, эксклюзионной хроматографии и связывания с антителами, которые связываются с правильно свернутым (стабильным тримерным) или в качестве альтернативы неправильно свернутым (нестабильным или нетримерным) белком Env, и повышенные процентная доля тримеров и/или выход тримеров считаются показателями стабильного нативного правильно свернутого белка Env.

Вирус иммунодефицита человека (HIV) является представителем рода *Lentivirinae*, который является частью семейства *Retroviridae*. Человека инфицируют две разновидности HIV: HIV-1 и HIV-2. HIV-1 представляет собой наиболее распространенный штамм вируса HIV и, как известно, является более патогенным, чем HIV-2. Используемые в данном документе термины "вирус иммунодефицита человека" и "HIV" относятся без ограничения к HIV-1 и HIV-2. В предпочтительных вариантах осуществления HIV относится к HIV-1.

HIV подразделяется на несколько клад с высокой степенью генетической дивергенции. Используемые в данном документе термины "клада HIV" или "подтип HIV" относятся к родственным вирусам иммунодефицита человека, классифицированным согласно степени их генетического сходства. Самая большая группа изолятов HIV-1 называется группой M (главные штаммы) и состоит из по меньшей мере десяти клад, от A до J.

В одном общем аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному белку оболочки (Env) HIV. При ссылке на белок термин "рекомбинантный" относится к белку, который получен с помощью рекомбинантной методики или с помощью химического синтеза *in vitro*. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения "рекомбинантный" белок имеет искусственную аминокислотную последовательность, в

которой он содержит по меньшей мере один элемент последовательности (например, аминокислотную замену, делецию, добавление, замещение последовательности и т. д.), который не встречается в соответствующей встречающейся в природе последовательности. Предпочтительно "рекомбинантный" белок представляет собой не встречающийся в природе белок оболочки HIV, который оптимизирован для индукции иммунного ответа или обеспечения выработки иммунитета против одного или нескольких встречающихся в природе штаммов HIV.

Термины "белок оболочки HIV", "Env HIV" и "белок Env HIV" относятся к белку или его фрагменту или производному, который в природе экспрессируется на оболочке вириона HIV и позволяет HIV нацеливаться на плазматическую мембрану инфицируемых HIV клеток и прикрепляться к ней. Термины "оболочка" и "Env" используются взаимозаменяемо на всем протяжении настоящего раскрытия. Ген env HIV кодирует белок-предшественник gp160, который подвергается протеолитическому расщеплению на два зрелых гликопротеина оболочки gp120 и gp41. Реакцию расщепления в мотиве последовательности, который является высококонсервативным среди предшественников гликопротеинов оболочки ретровирусов, опосредует протеаза клетки-хозяина, фурин (или фуриноподобные протеазы). Более конкретно, gp160 тримеризируется в (gp160)<sub>3</sub>, а затем подвергается расщеплению на два нековалентно связанных зрелых гликопротеина gp120 и gp41. Проникновение вируса в клетку впоследствии опосредует тример из гетеродимеров gp120/gp41. Gp120 представляет собой рецепторсвязывающий фрагмент, и он связывается с рецептором (и корецептором) CD4 на клетке-мишени, которая имеет такой рецептор, такой как, например, Т-хелперная клетка. Gp41, который нековалентно связан с gp120, представляет собой фрагмент слияния и обеспечивает вторую стадию, посредством которой HIV проникает в клетку. Gp41 изначально погружен внутрь оболочки вируса, но когда gp120 связывается с рецептором и корецептором CD4, gp120 меняет свою конформацию, что приводит к тому, что gp41 становится доступным и при этом может способствовать слиянию с клеткой-хозяином. Gp140 представляет собой эктодомен gp160.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения "белок оболочки (Env) HIV" может представлять собой белок gp160 или gp140, или их комбинации, слияния, усечения или производные. Например, "белок оболочки HIV" может предусматривать белок gp120, нековалентно связанный с белком gp41. "Белок оболочки HIV" также может представлять собой усеченный белок оболочки HIV, в том числе без ограничения белки оболочки, содержащие С-концевое усечение в эктодоме (т. е. домене, который выступает во внеклеточное пространство), усечение в gp41, такое как усечение в эктодоме gp41, в трансмембранном домене gp41 или усечение в цитоплазматическом домене gp41. Белок оболочки HIV также может представлять собой gp140, соответствующий эктодоме gp160, или удлиненную или усеченную версию gp140. Экспрессия белков gp140 была описана в нескольких публикациях (например, Zhang et al., 2001; Sanders et al., 2002; Harris et al., 2011), а также можно заказать разные варианты этого белка, например, на основе разных штаммов HIV, у поставщиков услуг.

Белок gp140 согласно настоящему изобретению может иметь мутацию в сайте расщепления, вследствие чего домен gp120 и эктодомен gp41 не подвергаются расщеплению и остаются ковалентно связанными, или в качестве альтернативы домен gp120 и эктодомен gp41 могут подвергаться расщеплению, но при этом ковалентно связаны, например, с помощью дисульфидного мостика (у примеру, такого как в SOSIP-вариантах). "Белок оболочки HIV" может дополнительно представлять собой производное встречающегося в природе белка оболочки HIV, имеющее мутации последовательности, например, в сайтах расщепления фурином, и/или так называемые мутации SOSIP. Белок оболочки HIV согласно настоящему изобретению также может иметь сайт расщепления фурином, вследствие чего эктодомены gp120 и gp41 могут быть связаны нековалентно.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения белок Env HIV представляет собой белок gp140 или белок gp160, и более предпочтительно белок gp140. В других предпочтительных вариантах осуществления белок Env является усеченным, например, за счет делеции остатков после 7-го остатка цитоплазматической области, по сравнению с природным белком Env.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения "белок оболочки HIV" может представлять собой тример или мономер, и предпочтительно представляет собой тример. Тример может представлять собой гомотример (например, тримеры, содержащие три идентичные полипептидные единицы) или гетеротример (например, тримеры, содержащие три полипептидные единицы, которые не являются идентичными). Предпочтительно тример представляет собой гомотример. В случае расщепленного gp140 или gp160 он представляет собой тример из полипептидных единиц, которые являются димерами gp120-gp41, и в случае, когда все три данных димера являются одинаковыми, он считается гомотримером.

"Белок оболочки HIV" может представлять собой растворимый белок или мембраносвязанный белок. Мембраносвязанные белки оболочки, как правило, содержат трансмембранный домен, такой как в полноразмерном белке оболочки HIV, содержащем трансмембранный домен (ТМ), показанный на ФИГ. 1А. Мембраносвязанные белки могут иметь цитоплазматический домен, но наличие цитоплазматического домена не является необходимым, чтобы быть мембраносвязанными. В случае растворимых белков оболочки предусматривается по меньшей мере частичная или полная делеция трансмембранного домена. Например, С-концевой участок полноразмерного белка оболочки HIV может быть усечен для удаления трансмембранного домена, с обеспечением тем самым получения растворимого белка, показанного на ФИГ. 1В. Однако белок оболочки HIV все-таки может быть растворимым при более коротких усечениях и усечениях в положениях, альтернативных показанным на ФИГ. 1В. Усечение может выполняться в различных положениях, и неограничивающие примеры включают усечение после аминокислоты 664, 655, 683 и т. д., все они приводят к получению растворимого белка. Мембраносвязанный белок Env согласно настоящему изобретению может содержать полный С-концевой домен или его часть (например, за счет делеции части С-концевого цитоплазматического домена,

например, в некоторых вариантах осуществления после 7-го остатка цитоплазматической области) по сравнению с нативным белком Env.

Сигнальный пептид, как правило, присутствует на N-конце белка Env HIV во время экспрессии, но отщепляется сигнальной пептидазой и, таким образом, не присутствует в зрелом белке. Сигнальный пептид может быть замещен на другие сигнальные последовательности, и два неограничивающих примера сигнальных пептидов представлены в данном документе под SEQ ID NO: 11, 18, 33 и 34.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения белок оболочки HIV, например, gp160 или gp140, может происходить из последовательности белка оболочки HIV из любой кланды (или 'подтипа') HIV, например, кланды А, кланды В, кланды С, кланды D, кланды Е, кланды F, кланды G, кланды Н и т. д., или их комбинаций (таких как 'циркулирующие рекомбинантные формы', или CRF, происходящие за счет рекомбинации между вирусами различных подтипов, например, BC, AE, AG, BE, BF, ADG и т. д.). Последовательность белка оболочки HIV может представлять собой встречающуюся в природе последовательность, мозаичную последовательность, консенсусную последовательность, синтетическую последовательность или любое их производное или фрагмент. "Мозаичная последовательность" содержит несколько эпитопов, происходящих из по меньшей мере трех последовательностей белка оболочки HIV из одной или нескольких кланд HIV, и она может быть сконструирована с помощью алгоритмов, которые оптимизируют охват Т-клеточных эпитопов. Примеры последовательностей мозаичных белков оболочки HIV включают описанные в, например, Barouch et al, Nat Med 2010, 16: 319-323; и WO 2010/059732, такие как, например, показанные под SEQ ID NO: 8 и 9. Используемая в данном документе "консенсусная последовательность" означает искусственную последовательность аминокислот на основе выравнивания аминокислотных последовательностей гомологичных белков, например, определенных с помощью выравнивания (например, с применением Clustal Omega) аминокислотных последовательностей гомологичных белков. Она представляет собой рассчитанный порядок аминокислотных остатков, наиболее часто встречающихся в каждом положении при выравнивании последовательностей, на основании последовательностей Env, полученных из по меньшей мере 1000 природных изолятов HIV. "Синтетическая последовательность" представляет собой не встречающийся в природе белок оболочки HIV, который оптимизирован для индукции иммунного ответа или обеспечения выработки иммунитета против более чем одного встречающегося в природе штамма HIV. Неограничивающими примерами синтетических белков оболочки HIV являются мозаичные белки оболочки HIV. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения исходный белок Env HIV представляет собой консенсусный белок Env или синтетический белок Env. В исходный белок Env вводят мутацию с получением аминокислоты Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu, предпочтительно Val или Ile, в положении 658. Необязательно такой белок Env HIV может дополнительно содержать по меньшей мере одну из указанных аминокислот в указанных положениях (i)-(vii), как



описано в данном документе в таблице 1. Особенно предпочтительными являются консенсусные белки Env, имеющие по меньшей мере один, предпочтительно по меньшей мере два из указанных аминокислотных остатков в указанных положениях (i) - (vii), предпочтительно дополнительно имеющие мутации SOSIP и/или мутации сайта расщепления фурином, описываемые ниже.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения белок оболочки HIV, будь то встречающаяся в природе последовательность, мозаичная последовательность, консенсусная последовательность, синтетическая последовательность и т. д., содержит дополнительные мутации последовательности например, в сайтах расщепления фурином и/или так называемые мутации SOSIP.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения белок оболочки HIV содержит дополнительные мутации и представляет собой "белок Env HIV с мутациями SOSIP". Так называемые мутации SOSIP представляют собой стабилизирующие тример мутации, которые включают 'мутации SOS' (остатки Cys в положениях 501 и 605, которые приводят к введению возможного дисульфидного мостика между новообразованными остатками цистеина) и 'мутацию IP' (остаток Pro в положении 559). Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения белок Env в мутациями SOSIP содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из Cys в положениях 501 и 605; Pro в положении 559; и предпочтительно Cys в положениях 501 и 605 и Pro в положении 559. Белок Env HIV с мутациями SOSIP может дополнительно содержать другие мутации последовательности, например, в сайте расщепления фурином. Кроме того, в определенных вариантах осуществления возможно дополнительное добавление мутаций, вследствие чего белок Env содержит Pro в положении 556, или в положении 558, или в положениях 556 и 558, которые, как было обнаружено, могут выполнять функцию не только альтернативы Pro в положении 559 в SOSIP-варианте, но также служить дополнительными мутациями, которые могут дополнительно обеспечивать увеличивать образование тримеров SOSIP-вариантом, который уже имеет Pro в положении 559.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения белок Env HIV с мутациями SOSIP содержит Cys в положениях 501 и 605 и Pro в положении 559.

В определенных вариантах осуществления белок оболочки HIV по настоящему изобретению дополнительно содержит мутацию в сайте расщепления фурином. Мутация в последовательности расщепления фурином может представлять собой аминокислотную замену, делецию, вставку или замещение одной последовательности на другую, или замещение на линкерную аминокислотную последовательность. Предпочтительно в настоящем изобретении мутирование сайта расщепления фурином можно применять для оптимизации сайта расщепления, вследствие чего расщепление фурином улучшается по сравнению белком дикого типа, например, за счет замещения последовательности в остатках 508-511 на RRRRRR (SEQ ID NO: 10) [т. е. замещение типичной аминокислотной

последовательности (например, ЕК) в положениях 509-510 на четыре остатка аргинина (т.е. два замещения и два добавления), в то же время в положениях 508 и 511 у большинства белков Env HIV уже присутствуют остатки аргинина, поэтому они, как правило, не требуют замещения, но поскольку конечный результат в литературе часто обозначают как аминокислотную последовательность RRRRRR, авторы настоящего изобретения сохранили такую номенклатуру в данном документе]. Также известны другие мутации, которые улучшают расщепление фурином, и их также можно применять. В качестве альтернативы можно замещать сайт расщепления фурином на линкер, вследствие чего будет отсутствовать необходимость расщепления, а белок будет принимать конформацию, подобную нативной (например, описано в (Sharma et al, 2015) и (Georgiev et al, 2015)).

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения белок оболочки HIV по настоящему изобретению дополнительно содержит не только так называемые мутации SOSIP (предпочтительно Cys в положениях 501 и 605 и Pro в положении 559), но и мутацию последовательности в сайте расщепления фурином, предпочтительно замещение последовательности в остатках 508-511 на RRRRRR (SEQ ID NO: 10). В определенных предпочтительных вариантах осуществления Env HIV содержит не только указанные мутации SOSIP и мутацию сайта расщепления фурином, но и, кроме того, дополнительно содержит остаток Pro в положении 556 или 558, наиболее предпочтительно в обоих из положений 556 и 558.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислотная последовательность белка оболочки HIV представляет собой консенсусную последовательность, такую как консенсусную последовательность белка оболочки HIV клады С или консенсусную последовательность белка оболочки HIV клады В. В особенно предпочтительном варианте осуществления аминокислотная последовательность белка оболочки HIV представляет собой консенсусную последовательность белка оболочки HIV клады С.

Иллюстративные белки оболочки HIV, которые можно применять согласно настоящему изобретению, включают консенсусную последовательность белка оболочки HIV клады С (SEQ ID NO: 2) и консенсусную последовательность белка оболочки HIV клады В (SEQ ID NO: 4). Эти консенсусные последовательности белка оболочки HIV клады С и клады В могут содержать дополнительные мутации, которые, например, увеличивают стабильность и/или образование тримеров, такие как, например, так называемые мутации SOSIP и/или мутация последовательности в сайте расщепления фурином, описываемые выше, такие как, например, в последовательности ConC\_SOSIP, показанной под SEQ ID NO: 3, и в последовательности ConB\_SOSIP, показанной под SEQ ID NO: 5.

Другие неограничивающие примеры предпочтительных последовательностей белка оболочки HIV, которые можно применять в настоящем изобретении (в качестве 'фоновой' или 'исходной' молекулы, в которой положение 658 затем подвергают мутации по типу замены на Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu), включают синтетические белки Env

HIV, например, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 6 с мутацией по типу замены Glu на Arg в положении 166, либо белки, необязательно имеющие дополнительные мутации SOSIP и/или мутации сайта расщепления фурином, описываемые выше. Другим неограничивающим примером является SEQ ID NO: 7. Дополнительными неограничивающими примерами являются мозаичные белки оболочки HIV, так как имеющие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или 9.

В определенных вариантах осуществления исходная молекула представляет собой белок Env HIV дикого типа, где одна или предпочтительно несколько аминокислот были восстановлены согласно способам, описанным в данном документе. Такие исходные молекулы содержат по меньшей мере одну восстанавливающую мутацию по аминокислотному остатку, который присутствует в соответствующем положении с частотой, составляющей менее 7,5%, предпочтительно менее 2% последовательностей Env HIV в совокупности из по меньшей мере 100, предпочтительно по меньшей мере 500, предпочтительно по меньшей мере 1000, предпочтительно по меньшей мере 10000, предпочтительно по меньшей мере 20000 последовательностей Env HIV дикого типа, где восстанавливающая мутация представляет собой замену на аминокислотный остаток, который присутствует в соответствующем положении с частотой, составляющей по меньшей мере 10% последовательностей Env HIV в указанной совокупности. Предпочтительно указанную замену осуществляют на аминокислотный остаток, который присутствует в соответствующем положении с частотой, составляющей по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25% последовательностей Env HIV в указанной совокупности. Предпочтительно указанную замену осуществляют на аминокислотный остаток, который наиболее часто присутствует в соответствующем положении в указанной совокупности. В определенных предпочтительных вариантах осуществления указанные исходные молекулы содержат по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или по меньшей мере 20 таких восстанавливающих мутаций. Предпочтительно по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% аминокислотных остатков или все из них, которые присутствуют в соответствующих положениях с частотой, составляющей менее 2% последовательностей Env HIV в указанной совокупности, являются восстановленными в исходной молекуле по сравнению с белком Env дикого типа. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% аминокислотных остатков или все из них, которые присутствуют в соответствующих положениях с частотой, составляющей менее 7,5% последовательностей Env HIV в указанной совокупности, являются восстановленными в исходной молекуле по сравнению с белком Env дикого типа. В определенных вариантах осуществления белок Env HIV дикого типа получен из штамма клады А, В или С, предпочтительно из штамма клады С. Вследствие таких восстанавливающих мутаций исходная молекула будет проявлять больше сходства с консенсусной последовательностью Env HIV, чем оригинальный штамм дикого типа, так

что восстановленный аминокислотный остаток в данном документе иногда называется 'консенсусная аминокислота' или 'консенсусный остаток'. Результатом данных действий по восстановлению является значительное улучшение свойств полученной исходной молекулы с точки зрения сворачивания, тримеризации, экспрессии и/или стабильности, и полученная молекула обозначается в данном документе как 'восстановленный белок Env'. Добавление стабилизирующих мутаций (например, (xvi) (таблица 1), и/или одной или нескольких из (i)-(vii) (таблица 1), и/или необязательно (viii) - (xv) (таблица 2)) в такие исходные молекулы приводит к еще большему улучшению одного или нескольких параметров из процентной доли образования тримеров, выхода тримеров, стабильности, связывания нейтрализующими антителами широкого спектра действия, сворачивания, и полученные молекулы, которые происходят из белков Env HIV дикого типа, обозначаются в данном документе как 'восстановленный и стабилизированный белок Env'. Специалисту в данной области будет очевидно, что введение стабилизирующих мутаций фактически немного отводит полученную последовательность от консенсусной последовательности, так что конечный результат, заключающийся в значительном улучшении свойств восстановленных и стабилизированных молекул Env HIV, основан на двух полностью отличающихся концепциях.

Мутации, приводящие к замене аминокислоты в положении 658 на аминокислоту Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu, необязательно дополнительно на указанные аминокислоты в положениях (i) - (vii), как описано в таблице 1, также можно применять в белках Env HIV, в которых не присутствуют мутации SOSIP (например, в консенсусных последовательностях Env или в белках Env из изолятов HIV дикого типа), и они, по-видимому, также улучшат их тримеризацию, поскольку мутации по настоящему изобретению являются независимыми от мутаций SOSIP и, кроме того, было показано, что мутации, описанные в данном документе, работают в нескольких различных каркасных последовательностях белков Env HIV. Действительно, показано, что мутации (i)-(vii) могут работать в отсутствие мутаций SOS, а также в отсутствие мутации IP, приводя к улучшению свойств тримеризации Env HIV.

Рекомбинантный белок оболочки HIV согласно вариантам осуществления настоящего изобретения предусматривает белок оболочки HIV, имеющий определенный(ые) аминокислотный(ые) остаток(остатки) в заданных положениях аминокислотной последовательности белка оболочки HIV. В частности, было показано, что в положение 658 в белке Env можно вводить мутацию для улучшения образования тримеров белка Env, где нумерация положений соответствует нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1. Кроме того, в дополнительных вариантах осуществления идентифицированы семь положений в белке оболочки, а также конкретные аминокислотные остатки, которые оптимально должны находиться в каждом из идентифицированных положений. Эти идентифицированные положения в последовательности белка оболочки включают (i) положение 651, (ii) положение 655, (iii) положение 535, (iv) положение 589, (v) положение 573, (vi) положение 204 и (vii)

положение 647, где нумерация положений соответствует нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1. Белок Env HIV согласно настоящему изобретению имеет Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu, предпочтительно Val или Ile, более предпочтительно Val, в положении 658 и необязательно имеет заданный(ые) аминокислотный(ые) остаток(остатки) в по меньшей мере одном из указанных положений (i) - (vii), предпочтительно в по меньшей мере двух из указанных положений (i) - (vii), более предпочтительно в по меньшей мере трех из указанных положений (i) - (vii). Конкретные аминокислотные остатки, которые оптимально должны находиться в каждом из указанных положений (i)-(vii), показаны в таблице 1. Предпочтительными положениями из этих вариантов являются (i), (ii), (iii), (iv), (vi) и/или (vii). Особенно предпочтительными положениями из этих вариантов являются (i), (ii), (iii), (iv) и/или (vii).

Таблица 1. Необходимые аминокислоты в указанных положениях рекомбинантных белков Env HIV согласно определенным вариантам осуществления

| <u>№</u> | <u>Положение<sup>1</sup></u> | <u>Оптимальный аминокислотный остаток</u>                                                         |
|----------|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (i)      | 651                          | Phe, Leu, Met или Trp<br>(предпочтительно Phe)                                                    |
| (ii)     | 655                          | Phe, Ile, Met или Trp<br>(предпочтительно Ile)                                                    |
| (iii)    | 535                          | Asn или Gln<br>(предпочтительно Asn)                                                              |
| (iv)     | 589                          | Val, Ile или Ala<br>(предпочтительно Val или Ile,<br>наиболее предпочтительно Val)                |
| (v)      | 573                          | Phe или Trp<br>(предпочтительно Phe)                                                              |
| (vi)     | 204                          | Ile                                                                                               |
| (vii)    | 647                          | Phe, Met или Ile<br>(предпочтительно Phe)                                                         |
| (xvi)    | 658                          | Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu<br>(предпочтительно Val или Ile,<br>наиболее предпочтительно Val) |

<sup>1</sup> Согласно нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1

Аминокислотная последовательность белка оболочки HIV, в которую введены Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu в положение 658 и необязательно одна или несколько необходимых замен аминокислот (или указанных аминокислот) в одном или нескольких других указанных положениях, обозначается как "каркасная последовательность белка оболочки HIV" или "исходная последовательность белка оболочки HIV." Например, если

в положении 658 в последовательности ConC\_SOSIP под SEQ ID NO: 3 осуществляли мутацию по типу замены на Val, то последовательность ConC\_SOSIP считается "каркасной" или "исходной" последовательностью. Любой белок оболочки HIV можно применять в качестве "каркасной" или "исходной" последовательности, в которую можно вводить новую стабилизирующую мутацию согласно варианту осуществления настоящего изобретения, либо отдельно, либо в комбинации с другими мутациями, такими как так называемые мутации SOSIP и/или мутации в сайте расщепления фурином. Неограничивающие примеры белка Env HIV, который можно применять в качестве каркасной последовательности, включают белок Env HIV из природного изолята HIV, синтетический белок Env HIV или консенсусный белок Env HIV, и в определенных неограничивающих примерах включают белки, содержащие SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 (где в случае последних четырех последовательностей на С-конце могут быть добавлены дополнительные аминокислоты из природных белков Env, и в положении 658 затем осуществляют мутацию по типу замены на Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu; это можно осуществлять в случае любой последовательности Env, которая оканчивается до положения 658 в соответствии с нумерацией в gp160 из изолята HXB2 HIV-1.).

Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения, кроме того, что он имеет Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu в положении 658, белок оболочки HIV необязательно может иметь указанный аминокислотный остаток в по меньшей мере одном из указанных положений, выбранных из группы, состоящей из положений 651, 655, 535, 589, 573, 204 и 647, как, например, указанный аминокислотный остаток из таблицы 1 в одном, двух, трех, четырех, пяти, шести или семи положениях. Предпочтительно белок оболочки HIV подвергают замене в одном, двух или трех из указанных положений, и более предпочтительно белок оболочки HIV подвергают замене в по меньшей мере двух из указанных положений. Еще более предпочтительно белок оболочки HIV подвергают замене в трех из указанных положений, четырех из указанных положений, пяти из указанных положений, шести из указанных положений или всех семи из указанных положений. Предпочтительно белок оболочки HIV содержит указанные аминокислотные остатки в по меньшей мере двух из указанных положений. Более предпочтительно белок оболочки HIV содержит указанные аминокислотные остатки в трех из указанных положений. В других предпочтительных вариантах осуществления белок оболочки HIV содержит указанные аминокислотные остатки в четырех, пяти, шести или всех семи из указанных положений.

Варианты осуществления белков Env HIV, имеющих указанные аминокислоты в нескольких положениях (положения пронумерованы согласно нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1, затем следует однобуквенный аминокислотный код для остатка, присутствующего в этом положении, положения в пределах одного варианта осуществления белка Env HIV отделены запятыми [например, вариант осуществления белка Env, имеющего Ile в положении 655 и Val в положении 658, описывают как 655I,

658V], при этом различные варианты осуществления (т. е. различные белки Env HIV) отделены точкой с запятой), включают без ограничения следующие.

В случае белков Env с указанными аминокислотами в двух положениях: 651F, 658V; 651F, 658I; 651F, 658F; 651F, 658M; 651F, 658A; 651F, 658L; 655I, 658V; 655I, 658I; 655I, 658F; 655I, 658M; 655I, 658A; 655I, 658L; 655F, 658V; 655F, 658I; 655F, 658F; 655F, 658M; 655F, 658A; 655F, 658L; 535N, 658V; 535N, 658I; 535N, 658F; 535N, 658M; 535N, 658A; 535N, 658L; 589V, 658V; 589V, 658I; 589V, 658F; 589V, 658M; 589V, 658A; 589V, 658L; 589I, 658V; 589I, 658I; 589I, 658F; 589I, 658M; 589I, 658A; 589I, 658L; 573F, 658V; 573F, 658I; 573F, 658F; 573F, 658M; 573F, 658A; 573F, 658L; 204I, 658V; 204I, 658I; 204I, 658F; 204I, 658M; 204I, 658A; 204I, 658L; 647F, 658V; 647F, 658I; 647F, 658F; 647F, 658M; 647F, 658A; 647F, 658L. Каждый из этих вариантов осуществления может присутствовать в любой последовательности Env HIV, такой как изолят дикого типа, или белок Env HIV с мутациями SOSIP, или консенсусный белок Env HIV, или синтетический белок Env HIV. Согласно настоящему изобретению каждый из этих вариантов осуществления можно комбинировать с одной из предпочтительных аминокислот во втором положении из одного из остальных указанных положений (i) - (vii). Такие варианты осуществления, имеющие предпочтительные аминокислотные остатки в двух положениях из указанных положений (i) - (vii), можно комбинировать с одной из предпочтительных аминокислот в третьем положении, выбранном из одного из остальных указанных положений (i) - (vii). Такие варианты осуществления, имеющие предпочтительные аминокислотные остатки в трех положениях из указанных положений (i) - (vii), можно комбинировать с одной из предпочтительных аминокислот в четвертом положении, выбранном из одного из остальных указанных положений (i) - (vii). Такие варианты осуществления, имеющие предпочтительные аминокислотные остатки в четырех положениях из указанных положений (i) - (vii), можно комбинировать с одной из предпочтительных аминокислот в пятом положении, выбранном из одного из остальных указанных положений (i) - (vii). Такие варианты осуществления, имеющие предпочтительные аминокислотные остатки в пяти положениях из указанных положений (i) - (vii), можно комбинировать с одной из предпочтительных аминокислот в шестом положении, выбранном из одного из остальных указанных положений (i) - (vii). Такие варианты осуществления, имеющие предпочтительные аминокислотные остатки в шести положениях из указанных положений (i) - (vii), можно комбинировать с одной из предпочтительных аминокислот в седьмом положении, выбранном из одного из остальных указанных положений (i) - (vii), вследствие чего белок Env имеет предпочтительную аминокислоту во всех семи положениях (i) - (vii). Любой из этих дополнительных вариантов осуществления, имеющий предпочтительную аминокислоту в двух, трех, четырех, пяти, шести или семи из положений (v) - (vii), может присутствовать в любом белке Env HIV, таком как белок из изолята дикого типа, SOSIP-вариант, консенсусный белок Env HIV, синтетический белок Env HIV и т. п.

Некоторые неограничивающие примеры белков Env HIV с указанными

аминокислотами в двух положениях из (i) - (vii) представляют собой следующие: 658V, 651F, 655I; 658I, 651F, 655I; 658V, 651F, 535N; 658I, 651F, 535N; 658V, 651F, 589V; 658I, 651F, 589V; 658V, 651F, 204I; 658I, 651F, 204I; 658V, 651F, 647F; 658I, 651F, 647F; 658V, 655I, 535N; 658I, 655I, 535N; 658V, 655I, 589V; 658I, 655I, 589V; 658V, 655I, 204I; 658I, 655I, 204I; 658V, 655I, 647F; 658V, 655I, 647F; 658V, 535N, 589V; 658I, 535N, 589V; 658V, 535N, 204I; 658I, 535N, 204I; 658V, 535N, 647F; 658I, 535N, 647F; 658V, 589V, 204I; 658I, 589V, 204I; 658V, 589V, 647F; 658I, 589V, 647F; 658V, 204I, 647F; 658I, 204I, 647F.

Некоторые примеры особенно предпочтительных белков Env, имеющих предпочтительные аминокислоты в по меньшей мере двух положениях из (i) - (vii) включают: 658V, 651F, 655I; 658I, 651F, 655I; 658V, 651F, 535N; 658I, 651F, 535N; 658V, 651F, 589V; 658I, 651F, 589V; 658V, 655I, 535N; 658I, 655I, 535N; 658V, 655I, 589V; 658I, 655I, 589V.

Некоторые примеры предпочтительных белков Env, имеющих предпочтительные аминокислоты в по меньшей мере трех положениях из (i) - (vii) включают: 658V, 651F, 655I, 535N; 658V, 655I, 589V, 535N; 658V, 655I, 573F, 589V; 658V, 655I, 204I, 589V; 658V, 651F, 655I, 647F.

Некоторые примеры предпочтительных белков Env HIV, имеющих предпочтительные аминокислотные остатки в по меньшей мере четырех положениях из (i) - (vii), включают: 651F, 655I, 647F, 535N; 651F, 655I, 573F, 589V. Предпочтительный пример белка Env HIV, содержащего указанные аминокислотные остатки в по меньшей мере четырех положениях из (i) - (vii), включает 535N, 589V, 651F, 655I. Неограничивающие примеры таких белков Env HIV представлены под SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31 и 32. Предпочтительно такой белок Env HIV представляет собой белок Env HIV клады C или белок Env HIV клады A, наиболее предпочтительно белок Env HIV клады C. В определенных вариантах осуществления указанный белок Env HIV дополнительно содержит 588E, т. е. он содержит по меньшей мере 535N, 588E, 589V, 651F, 655I. Неограничивающие примеры такого белка Env HIV представлены под SEQ ID NO: 20, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31 и 32. В определенных вариантах осуществления указанный Env HIV дополнительно содержит 556P, т. е. он содержит по меньшей мере 535N, 556P, 589V, 651F, 655I или по меньшей мере 535N, 556P, 588E, 589V, 651F, 655I. Неограничивающие примеры такого белка Env HIV представлены под SEQ ID NO: 22, 24, 26, 27, 29, 30, 31 и 32. Каждую из этих молекул иллюстративных вариантов осуществления можно дополнительно модифицировать с получением варианта осуществления настоящего изобретения путем мутации аминокислоты в положении 658 по типу замены на V, I, F, M, A или L, предпочтительно V (кроме SEQ ID No: 29, 30 и 31, где аминокислота в положении 658 уже представляет собой V).

В одном варианте осуществления рекомбинантный белок Env HIV согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность белка Env HIV, имеющую Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu, предпочтительно Val или Ile, предпочтительно Val, в положении 658 и указанный аминокислотный остаток в по меньшей мере одном из



указанных положений, выбранных из группы, состоящей из:

- (i) Phe, Leu, Met или Trp, предпочтительно Phe, в положении 651;
- (ii) Phe, Ile, Met или Trp, предпочтительно Ile, в положении 655;
- (iii) Asn или Gln, предпочтительно Asn, в положении 535;
- (iv) Val, Ile или Ala, предпочтительно Val, в положении 589;
- (v) Phe или Trp, предпочтительно Phe, в положении 573;
- (vi) Ile в положении 204; и
- (vii) Phe, Met или Ile, предпочтительно Phe, в положении 647.

Например, рекомбинантный белок Env HIV может иметь Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu в положении 658 и один из Phe, Leu, Met или Trp в положении 651, и необязательно дополнительные указанные аминокислотные остатки в дополнительных указанных положениях. Предпочтительно Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu в положении 658 или по меньшей мере одну аминокислоту из (i) - (vii) вводят в рекомбинантный белок Env HIV посредством аминокислотной замены. Например, рекомбинантный белок Env HIV можно получить из белка Env HIV, который не содержит Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu в положении 658 или который не содержит или содержит только один из аминокислотных остатков в вышеуказанных (i) - (vii), вследствие чего все или один или несколько из указанных аминокислотных остатков вводят в рекомбинантный белок Env HIV посредством аминокислотной замены.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению дополнительно содержит (viii) Gln, Glu, Ile, Met, Val, Trp или Phe в положении 588, где Gln или Glu являются предпочтительными.

Аминокислотная последовательность белка Env HIV, в которую вводят описанные выше замены, может представлять собой любой белок Env HIV, известный из уровня техники с учетом настоящего раскрытия, такой как, например, встречающаяся в природе последовательность HIV из клады А, клады В, клады С и т. д.; мозаичная последовательность; консенсусная последовательность, например, консенсусная последовательность из клады В или клады С; синтетическая последовательность или любое их производное или фрагмент. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислотная последовательность белка Env HIV содержит дополнительные мутации, такие как, например, так называемые мутации SOSIP и/или мутация в сайте расщепления фурином.

В одном конкретном варианте осуществления каркасный белок Env HIV представляет собой белок Env HIV с мутациями SOSIP, содержащий по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из Cys в положениях 501 и 605; Pro в положении 559. В предпочтительном варианте осуществления белок Env HIV с мутациями SOSIP содержит Cys в положениях 501 и 605 и Pro в положении 559. Согласно этому варианту осуществления рекомбинантный белок Env HIV содержит аминокислотную последовательность белка Env HIV с мутациями SOSIP и аминокислотную замену в положении 658 на Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu, предпочтительно Val или Ile, наиболее

предпочтительно Val, в этом положении и необязательно одну или несколько дополнительных аминокислотных замен на указанный аминокислотный остаток в по меньшей мере одном из указанных положений, выбранных из группы, состоящей из:

- (i) Phe, Leu, Met или Trp, предпочтительно Phe, в положении 651;
- (ii) Phe, Ile, Met или Trp, предпочтительно Ile, в положении 655;
- (iii) Asn или Gln, предпочтительно Asn, в положении 535;
- (iv) Val, Ile или Ala, предпочтительно Val, в положении 589;
- (v) Phe или Trp, предпочтительно Phe, в положении 573;
- (vi) Ile в положении 204; и
- (vii) Phe, Met или Ile, предпочтительно Phe, в положении 647.

белок Env HIV с мутациями SOSIP может дополнительно содержать мутацию в сайте расщепления фурином, такую как замещение в положениях 608-511 на SEQ ID NO: 10.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный белок Env HIV согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность белка Env HIV и аминокислотную замену в положении 658 на Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu, предпочтительно Val или Ile, наиболее предпочтительно Val, в этом положении и необязательно одну или несколько дополнительных аминокислотных замен на указанный аминокислотный остаток в по меньшей мере одном из указанных положений, выбранных из группы, состоящей из:

- (i) Phe, Leu, Met или Trp, предпочтительно Phe, в положении 651;
- (ii) Phe, Ile, Met или Trp, предпочтительно Ile, в положении 655;
- (iii) Asn или Gln, предпочтительно Asn, в положении 535;
- (iv) Val, Ile или Ala, предпочтительно Val, в положении 589;
- (v) Phe или Trp, предпочтительно Phe, в положении 573;
- (vi) Ile в положении 204; и
- (vii) Phe, Met или Ile, предпочтительно Phe, в положении 647,

где белок Env HIV выбран из группы, состоящей из:

(1) консенсусной последовательности Env HIV, такой как консенсусная последовательность из клады С или клады В, например, содержащая аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, 3, 4 или 5;

(2) синтетического белка Env HIV.

Предпочтительно рекомбинантный белок Env HIV содержит аминокислотную последовательность белка Env HIV и аминокислотную замену на указанный аминокислотный остаток в по меньшей мере двух из указанных положений, выбранных из группы, состоящей из вышеуказанных (i) - (vii), как, например, в двух положениях или трех положениях. Однако рекомбинантный белок Env HIV может содержать аминокислотную замену на указанный аминокислотный остаток в одном или нескольких из указанных положений (i) - (vii), например, в одном, двух, трех, четырех, пяти, шести или семи из указанных положений.

В одном конкретном варианте осуществления каркасный белок Env HIV представляет собой консенсусную последовательность Env HIV из клады С, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2. Предпочтительно консенсусная последовательность HIV из клады С под SEQ ID NO: 2 дополнительно содержит так называемые мутации SOSIP, т. е. Cys в положениях 501 и 605 и Pro в положении 559, и более предпочтительно дополнительно содержит так называемые мутации SOSIP и мутацию в сайте расщепления фурином, такую как, например, замещение в положениях 508-511 на SEQ ID NO: 10. В особенно предпочтительном варианте осуществления каркасный белок Env HIV содержит последовательность, показанную под SEQ ID NO: 3, или последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична ей, где предпочтительно аминокислоты в положениях 501, 559, 605 и 508-511, замещаемые на SEQ ID NO: 10, не мутированы по сравнению с SEQ ID NO: 3.

В другом конкретном варианте осуществления каркасный белок Env HIV представляет собой консенсусную последовательность Env HIV из клады В, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 4. Предпочтительно консенсусная последовательность HIV из клады В под SEQ ID NO: 4 дополнительно содержит так называемые мутации SOSIP, т. е. Cys в положениях 501 и 605 и Pro в положении 559, и более предпочтительно дополнительно содержит так называемые мутации SOSIP и мутацию в сайте расщепления фурином, такую как, например, замещение в положениях 508-511 на SEQ ID NO: 10. В особенно предпочтительном варианте осуществления каркасный белок Env HIV содержит последовательность, показанную под SEQ ID NO: 5, или последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична ей, где предпочтительно аминокислоты в положениях 501, 559, 605 и 508-511, замещаемые на SEQ ID NO: 10, не мутированы по сравнению с SEQ ID NO: 5.

В еще одном конкретном варианте осуществления каркасный белок Env HIV представляет собой синтетический белок Env HIV, например, содержащий аминокислотную последовательность под (a) SEQ ID NO: 6; (b) SEQ ID NO: 6 с мутацией по типу замены Glu на Arg в положении 166, (c) SEQ ID NO: 7; или (d) SEQ ID NO: 8 или 9, при этом (a), (b) или (d) необязательно имеют дополнительно мутации SOSIP (501C, 605C, 559P) и/или мутацию сайта расщепления фурином (508-511RRRRRR), описываемые выше.

В еще одних конкретных вариантах осуществления каркасный белок Env HIV представляет собой белок Env HIV из вируса HIV дикого типа из клады А или клады С, необязательно содержащий мутации для восстановления последовательности согласно способам, описанным в данном документе.

Иллюстративные комбинации двух положений из (i) - (vii) в белке Env HIV, в

которых можно одновременно производить замены, включают остатки 535, 589; 535, 647; и 589, 655; как, например, в двойных мутантах I535N, D589V; I535N, E647F; и D589V, K655I. Другие двойные мутанты включают K655I, I535N; N651F, K655I; и K655I, I573F. Иллюстративная комбинация из трех положений в белке Env HIV, в которых можно одновременно производить замены, включает 535, 589, 655, как, например, в тройном мутанте, I535N, D589V, K655I. Другие тройные мутанты включают K655I, D589V, I573F; и K655I, N651F, I535N.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения рекомбинантный белок Env HIV согласно настоящему изобретению (например, имеющий V, I, F, M, A или L в положении 658 и необязательно одну или несколько указанных аминокислот в вышеуказанных положениях (i) - (vii)) может дополнительно содержать указанный аминокислотный остаток (например, полученный за счет замены) в одном или нескольких дополнительных указанных положениях, выбранных из группы, состоящей из положений (viii) 588, (ix) 64 или 66, (x) 316, (xi) 201/433, (xii) 556, или 558, или 556 и 558, (xiii) 548-568, (xiv) 568, 569 и 636, или (xv) 302, 519 или 520, показанных в таблице 2 ниже. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что некоторые из этих аминокислотных замен (например, (viii)), очень хорошо комбинируются с мутациями (комбинациями мутаций) (i) - (vii), описанными выше. Остальные из этих аминокислотных замен ранее были описаны в литературе. Например, в De Taeye et al. (Cell (2015) 163(7), 1702-15) описан белок оболочки HIV, имеющий двойную мутацию E64K и T316W, и белок Env HIV, имеющий мутацию 66R; и в Kwon et al. (Nat. Struct. Mol. Biol. (2015) 22(7) 522-31) описан белок оболочки HIV, имеющий дисульфидную замену I204C, A433C; и в Guenaga et al. (Immunity (2017) 46, 792-803) описан белок оболочки HIV, имеющий L568G, T569G или N636G и тройную замену N302Y, F519R, L520R. Однако, насколько известно авторам настоящего изобретения, эти ранее описанные мутации не были описаны в комбинации с какой-либо из новых замен, описанных в данном документе, т. е. V, I, F, M, A или L в положении 658, или, например, замен, перечисленных в пунктах (i) - (vii) таблицы 1. Данные аминокислотные мутации в комбинации с аминокислотными заменами по настоящему изобретению могут дополнительно повышать выход тримеров и/или процентную долю образования тримеров. Данные аминокислотные замены можно вводить в любой из рекомбинантных белков Env HIV, описанных в данном документе, в дополнение к замене на указанный аминокислотный остаток в положении 658, и при этом который необязательно имеет дополнительные замены на указанный аминокислотный остаток в одном или нескольких из указанных положений, описываемых в таблице 1.

Таблица 2. Дополнительные положения аминокислотной замены и остаток для замены

| <u>№</u> | <u>Положение</u> <sup>1</sup> | <u>Указанный аминокислотный остаток</u> |
|----------|-------------------------------|-----------------------------------------|
|----------|-------------------------------|-----------------------------------------|

|        |                              |                                                                                                                                                                                                                                                   |
|--------|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (viii) | 588                          | Gln, Glu, Ile, Met, Val, Trp или Phe<br>(предпочтительно Gln или Glu)                                                                                                                                                                             |
| (ix)   | 64 или 66                    | Lys в положении 64 или<br>Arg в положении 66                                                                                                                                                                                                      |
| (x)    | 316                          | Trp                                                                                                                                                                                                                                               |
| (xi)   | 201 и 433                    | Cys в обоих положениях                                                                                                                                                                                                                            |
| (xii)  | 556 или 558 или 556 и<br>558 | Pro в любом положении или в них обоих                                                                                                                                                                                                             |
| (xiii) | 548-568 (HR1-петля)          | Замещение более короткой и менее гибкой<br>петлей, имеющей 7-10 аминокислот,<br>предпочтительно петель из 8 аминокислот,<br>например, имеющей последовательность,<br>выбранную из любой из (SEQ ID NO: 12-17)                                     |
| (xiv)  | 568, 569, 636                | Gly в любом из этих положений, или Gly в<br>обоих положениях 568 и 636, или Gly в обоих<br>из положений 569 и 636                                                                                                                                 |
| (xv)   | 302, 519, 520                | Tyr в положении 302, или Arg в положении<br>519, или Arg в положении 520, или Tyr в<br>положении 302 и Arg в положении 519, или Tyr<br>в положении 302 и Arg в положении 520, или<br>Tyr в положении 302 и Arg в обоих из<br>положений 519 и 520. |

1 Согласно нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1

Замены, идентифицированные в указанных положениях по настоящему изобретению [V, I, F, M, A или L в положении 658 и необязательно в любом из (i) - (vii), см. например, таблицу 1], не присутствуют или редко присутствуют в природных последовательностях, не обнаружены в комбинации с ранее описанными последовательностями белка Env HIV, и ранее не предполагалось, что они приводят к увеличенной тримеризации белка Env HIV, увеличенному выходу тримеров и/или повышению стабильности тримеров. Все мутации (ix) - (xi) в таблице 2 (которые были ранее описаны другими исследователями) находятся в области gp120, с которой связывается тримерспецифическое антитело PGT145. Данные мутации обеспечивают закрытое состояние тримера на вершине (которая представляет собой верхнюю часть молекулы). Все замены (xii) и (xiii) находятся в HR1 gp41. За исключением положения 204, все мутации по настоящему изобретению в таблице 1 находятся в области gp41 (в нижней части молекулы), но за пределами области HR1. Совершенно очевидно, что ранее

описанные мутации не давали основания для какого-либо предположения о введении мутаций по настоящему изобретению, не говоря уже об их неожиданных эффектах в отношении образования тримеров с закрытой вершиной, измеряемых с помощью связывания PGT145. Кроме точечных мутаций (viii) - (xii) из таблицы 2, также можно замещать петлю HR1 белка Env (аминокислотные остатки 548-568 в последовательности дикого типа с нумерацией согласно gp160 из изолята HXB2) более короткой и менее гибкой петлей, имеющей 7-10 аминокислот, предпочтительно петлей из 8 аминокислот, например, имеющей последовательность, выбранную из любой из (SEQ ID NO: 12-17), см., например, Kong et al (Nat Commun. 2016 Jun 28;7:12040. doi: 10.1038/ncomms12040), в которой описаны такие более короткие петли, замещающие петлю HR1. Такой вариант Env, дополнительно имеющий указанные аминокислотные остатки в положении 658 (V, I, F, M, A или L) и необязательно в по меньшей мере одном из указанных положений (i) - (vii), также представляет собой вариант осуществления настоящего изобретения. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения мутации, перечисленные в (viii) - (xiii), можно добавлять в белки Env HIV по настоящему изобретению, т. е. имеющие Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu в положении 658. В дополнительных вариантах осуществления их можно комбинировать с мутациями по типу замены на одну или несколько указанных аминокислот в положениях (i) - (vii). Также можно получать комбинации в пределах групп (viii) - (xiii), при этом неограничивающий пример представляет собой комбинацию мутаций (в дополнение к наличию Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu в положении 658 и необязательно дополнительно по меньшей мере одной мутации в (i) - (vii)) в (viii) и (xii) (например, 658V, A556P, K588E). Некоторые неограничивающие примеры белков Env HIV с указанной аминокислотой в одном из положений (viii) - (xii) представляют собой следующее: 658V, 588E; 658V, 588Q; 658V, 556P; 658V, 558P; 658V, 201C-433C; 658V; 636G; 658V, 568G; 658V, 569G; 658V, 519R; 658V, 520R.

Опять же, любой из этих вариантов осуществления можно осуществлять в любом белке Env HIV, например, изоляте дикого типа, консенсусной последовательности Env, синтетическом белке Env, белке Env с мутациями SOSIP и т. д.

Некоторые предпочтительные комбинации аминокислот в указанных положениях включают 655I, 589V, 573F, 651F, 588E, 535N, 204I; 556P, 655I, 535N, 573F, 589V, 204I, 588Q; 204I, 535N, 556P, 588E, 589V, 651F, 655I; 535N, 556P, 589V, 651F, 655I; и 535N, 556P, 588E, 589V, 651F, 655I, и каждую из них можно комбинировать с аминокислотным остатком, выбранным из V, I, F, M, A или L в положении 658.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления белок Env HIV содержит последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична, предпочтительно на по меньшей мере 96%, 97%, 98%, 99% идентична, предпочтительно на 100% идентична любой из SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31 и 32. Для определения % идентичности предпочтительно не принимают во внимание положения (i) - (xv) из таблиц 1 и 2, а также предпочтительно положения 501, 559 и 605.

Предпочтительно аминокислотные остатки в данных положениях представляют собой остатки из последовательностей под SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32 соответственно, за исключением того, что в SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26, 27, 28 и 32 аминокислота в положении 658 подвергнута мутации (или добавлена), в результате чего полученная аминокислота в данном положении представляет собой Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu, предпочтительно Val или Ile, наиболее предпочтительно Val. Было обнаружено, что он сильно повышал процентную долю тримеров и выхода тримеров белка Env, либо отдельно, либо в комбинации с мутациями, выбранными из (i) - (vii) таблицы 1 и/или (viii) - (xv) таблицы 2, описанными в данном документе.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения рекомбинантный белок Env HIV характеризуется по меньшей мере одним параметром из (a) увеличенной процентной доли образования тримеров и (b) увеличенного выхода тримеров по сравнению с белком Env HIV, не имеющим Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu в положении 658, при этом остальное является идентичным.

Используемая в данном документе "увеличенная процентная доля образования тримеров" означает, что большая процентная доля тримеров образуется, когда каркасная последовательность белка оболочки HIV содержит Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu в положении 658, по сравнению с процентной долей тримеров, образуемых в случае, когда каркасная последовательность последовательности белка оболочки HIV содержит остаток Lys в положении 658 (аминокислота, присутствующая у большинства природных вариантов Env HIV-1 из клады C в данном положении; Gln представляет собой наиболее часто встречающуюся аминокислоту в данном положении, если рассматриваются все штаммы, и предпочтительно большая процентная доля тримеров также образуется, если каркасная последовательность белка оболочки HIV содержит Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu в положении 658, по сравнению с процентной долей тримеров, образуемых в случае, когда каркасная последовательность последовательности белка оболочки HIV содержит остаток Gln в положении 658). В более широком смысле используемая в данном документе "увеличенная процентная доля образования тримеров" означает, что большая процентная доля тримера образуется, когда каркасная последовательность белка оболочки HIV содержит одну или несколько из аминокислотных замен, описанных в таблице 1 и/или 2, по сравнению с процентной долей тримера, образуемого в случае, когда каркасная последовательность последовательности белка оболочки HIV не содержит таких аминокислотных замен. Используемый в данном документе "увеличенный выход тримеров" означает, что большее общее количество тримерной формы получают, когда каркасная последовательность белка оболочки HIV содержит Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu в положении 658, по сравнению с общим количеством тримерной формы белка оболочки, получаемого в случае, когда каркасная последовательность последовательности белка оболочки HIV содержит остаток Lys в положении 658. В более широком смысле используемый в данном документе "увеличенный выход тримеров" означает, что большее общее количество тримерной формы получают, когда каркасная последовательность

белка оболочки HIV содержит одну или несколько из аминокислотных замен, описанных в таблице 1 или 2, по сравнению с общим количеством тримерной формы белка оболочки, получаемого в случае, когда каркасная последовательность последовательности белка оболочки HIV не содержит таких аминокислотных замен.

Образование тримеров можно измерять с помощью анализа связывания антителами с применением антител, которые специфически связываются с тримерной формой белка Env HIV. Примеры тримерспецифических антител, которые можно применять для выявления тримерной формы, включают без ограничения моноклональные антитела (mAb) PGT145, PGDM1400, PG16 и PGT151. Предпочтительно тримерспецифическое антитело представляет собой mAb PGT145. Любой анализ связывания антителами, известный из уровня техники в учетом настоящего раскрытия, можно применять для измерения процентной доли образования тримеров рекомбинантного белка Env HIV по настоящему изобретению, такой как ELISA, AlphaLISA и т. д.

В конкретном варианте осуществления образование тримеров измеряют с помощью AlphaLISA. AlphaLISA представляет собой анализ сближения на основе гранул, в котором синглетные молекулы кислорода, генерируемые за счет высокоэнергетического излучения донорных гранул, переносятся на акцепторные гранулы, которые расположены в пределах расстояния, составляющего приблизительно 200 нм, относительно донорных гранул. Перенос синглетных молекул кислорода на акцепторные гранулы инициирует каскад из серии химических реакций, приводящих к генерированию хемилюминесцентного сигнала, который затем можно выявлять (Eglen et al. *Curr. Chem. Genomics*, 2008, 25(1): 2-10). Например, рекомбинантные белки оболочки HIV, меченные с помощью Flag-His-метки, можно инкубировать с тримерспецифическим mAb, донорными гранулами, конъюгированными с антителом, которое связывается с тримерспецифическим mAb, конъюгированными с никелем донорными гранулами, акцепторными гранулами, конъюгированными с антителом к His-метке, и акцепторными гранулами, конъюгированными с антителом к Flag-метке. Количество образовавшегося тримера можно определять путем измерения хемилюминесцентного сигнала, генерируемого парой из донорных гранул, конъюгированных с антителом, которое связывается с тримерспецифическим mAb, и акцепторных гранул, конъюгированных с антителом к His-метке. Общее количество экспрессированного белка оболочки HIV можно определять путем измерения хемилюминесцентного сигнала, генерируемого парой из донорных гранул, конъюгированных с никелем, и акцепторных гранул, конъюгированных с антителом к Flag-метке. Например, количество тримера и общего экспрессированного белка оболочки можно измерять с помощью анализа AlphaLISA, как подробно описано в примере 3. Процентную долю образования тримеров можно рассчитать путем деления количества образовавшегося тримера на общее количество экспрессированного белка оболочки.

Количество образовавшегося тримера и общее количество экспрессированного белка оболочки также можно определять с применением хроматографических методик,



которые способны отделять тримерную форму от остальных форм белка оболочки HIV, например, мономерной формы. Примеры таких методик, которые можно применять, включают без ограничения эксклюзионную хроматографию-многоугловое светорассеяние (SEC-MALS). Согласно определенным вариантам осуществления процентную долю образования тримеров определяют с применением SEC-MALS. Согласно определенным вариантам осуществления выход тримеров определяют с применением SEC-MALS.

В настоящем изобретении в определенных вариантах осуществления также предусмотрен способ улучшения образования тримеров белка Env HIV, при этом способ включает осуществление замены остатка в положении 658 (обычно Lys) исходного белка Env HIV на Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu, предпочтительно Val или Ile, наиболее предпочтительно Val. Например, это можно осуществлять с применением стандартной технологии молекулярной биологии.

Нуклеиновая кислота, векторы и клетки

В другом общем аспекте в настоящем изобретении представлена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный белок Env HIV согласно настоящему изобретению, и вектор, содержащий данную молекулу нуклеиновой кислоты. Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут находиться в форме РНК или в форме ДНК, полученных путем клонирования или полученных синтетическим путем. ДНК может быть двухнитевой или однонитевой. ДНК, например, может предусматривать cDNA, геномную ДНК или их комбинации. Молекулы нуклеиновой кислоты и векторы можно применять для получения рекомбинантных белков, экспрессии белка в клетке-хозяине или получения вирусных частиц.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный белок оболочки HIV, функционально связана с промотором, что означает, что нуклеиновая кислота находится под контролем промотора. Промотор может представлять собой гомологичный промотор (т. е. происходящий из того же генетического источника, что и вектор) или гетерологичный промотор (т. е. происходящий из другого вектора или генетического источника). Примеры подходящих промоторов включают немедленно-ранний промотор цитомегаловируса человека (hCMV IE, или кратко "CMV") и промотор вируса саркомы Рауса (RSV). Промотор предпочтительно расположен в направлении 5' от данной нуклеиновой кислоты в кассете экспрессии.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения вектор может представлять собой вектор экспрессии. Векторы экспрессии включают без ограничения векторы для экспрессии рекомбинантного белка и векторы для доставки нуклеиновой кислоты в организм субъекта для экспрессии в ткани субъекта, как, например, вирусный вектор. Примеры вирусных векторов, подходящих для применения в настоящем изобретении, включают без ограничения аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса, поксвирусные векторы, векторы на основе модифицированного вируса коровьей оспы штамма Анкара (MVA), энтеровирусные

векторы, векторы на основе вируса венесуэльского энцефалита лошадей, векторы на основе вируса леса Семлики, векторы на основе вируса табачной мозаики, лентивирусные векторы и т. д. Вектор также может представлять собой невирусный вектор. Примеры невирусных векторов включают без ограничения плазмиды, искусственные бактериальные хромосомы, искусственные хромосомы дрожжей, бактериофаги и т. д.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения вектор представляет собой аденовирусный вектор, например, рекомбинантный аденовирусный вектор. Например, рекомбинантный аденовирусный вектор может происходить из аденовируса человека (HAdV, или AdHu) или аденовируса обезьян, такого как аденовирус шимпанзе или гориллы (ChAd, AdCh или SAdV) или аденовирус макака-резуса (rhAd). Предпочтительно аденовирусный вектор представляет собой вектор на основе рекомбинантного аденовируса человека, например, рекомбинантного аденовируса человека серотипа 26 или любого из рекомбинантных аденовирусов человека серотипов 5, 4, 35, 7, 48 и т. д. В других вариантах осуществления аденовирусный вектор представляет собой вектор rhAd, например, rhAd51, rhAd52 или rhAd53.

Получение рекомбинантных аденовирусных векторов хорошо известно из уровня техники. Например, получение векторов на основе рекомбинантного аденовируса 26 описано, например, в WO 2007/104792 и в Abbink et al., (2007) Virol. 81(9): 4654-63. Иллюстративные геномные последовательности аденовируса 26 находятся в GenBank под номером доступа EF 153474 и под SEQ ID NO: 1 в WO 2007/104792. Иллюстративные геномные последовательности rhAd51, rhAd52 и rhAd53 представлены в US 2015/0291935.

Согласно вариантами осуществления настоящего изобретения любой из рекомбинантных белков E<sub>nv</sub> HIV, описанных в данном документе, может экспрессироваться и/или кодироваться с помощью любого из векторов, описанных в данном документе. С учетом вырожденности генетического кода специалисту в данной области хорошо известно, что можно сконструировать несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, которые кодируют один и тот же белок, согласно способам, полностью соответствующим установленной практике в данной области. Нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный белок E<sub>nv</sub> HIV по настоящему изобретению, можно необязательно подвергнуть оптимизации кодонов для обеспечения надлежащей экспрессии в клетке-хозяине (например, клетках бактерий или млекопитающих). Оптимизация кодонов представляет собой технологию, широко применяемую в данной области техники.

В настоящем изобретении также представлены клетки, предпочтительно выделенные клетки, содержащие любые из молекул нуклеиновой кислоты и векторов, описанных в данном документе. Например, клетки можно применять для получения рекомбинантного белка или для получения вирусных частиц.

Таким образом, варианты осуществления настоящего изобретения также относятся к способу получения рекомбинантного белка E<sub>nv</sub> HIV. Способ предусматривает трансфекцию клетки-хозяина вектором экспрессии, содержащим нуклеиновую кислоту,

которая кодирует рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления настоящего изобретения, функционально связанную с промотором, выращивание трансфицированной клетки в условиях, подходящих для экспрессии рекомбинантного белка Env HIV, и необязательно очистку или выделение рекомбинантного белка Env HIV, экспрессированного в клетке. Рекомбинантный белок Env HIV можно быть выделенным или собранным из клетки с помощью любого способа, известного из уровня техники, в том числе аффинной хроматографии, эксклюзионной хроматографии и т. д. Методики, применяемые для экспрессии рекомбинантного белка, будут хорошо известны среднему специалисту в данной области с учетом настоящего раскрытия. Экспрессированный рекомбинантный белок Env HIV также можно исследовать без очистки или выделения экспрессированного белка, например, путем анализа супернатанта клеток, трансфицированных с помощью вектора экспрессии, кодирующего рекомбинантный белок Env HIV, и выращенных в условиях, подходящих для экспрессии белка Env HIV.

В предпочтительном варианте осуществления экспрессированный рекомбинантный белок Env HIV очищают в условиях, которые обеспечивают сборку белка таким образом, что образуется стабилизированный тримерный комплекс. Например, клетки млекопитающих, трансфицированные с помощью вектора экспрессии, кодирующего рекомбинантный белок Env HIV, функционально связанный с промотором (например, с промотором CMV), можно культивировать при 33-39°C, например, при 37°C, и 2-12% CO<sub>2</sub>, например, 8% CO<sub>2</sub>. Экспрессию также можно осуществлять в альтернативных системах экспрессии, таких как клетки насекомых или клетки дрожжей, все они традиционно применяются в области техники. Затем экспрессированный белок Env HIV можно выделять из культуры клеток с помощью, например, аффинной хроматографии с применением лектина, который связывает гликопротеины. Белок Env HIV, связавшийся с колонкой, можно элюировать с помощью маннопиранозида. При необходимости, белок Env HIV, элюированный из колонки, можно подвергать дополнительным стадиям очистки, как, например, эксклюзионной хроматографии, для удаления любых остаточных примесей, например, клеточных примесей, а также агрегатов Env, мономеров gp140 и мономеров gp120. Для выделения экспрессированного белка Env HIV также можно применять альтернативные способы очистки, при этом неограничивающие примеры включают аффинную хроматографию с применением антител, негативный отбор с помощью антител, отличных от bNAb, очистку с помощью антитела к метке или другие способы хроматографии, такие как ионообменная хроматография и т. д., а также другие способы, известные из уровня техники.

Молекулы нуклеиновой кислоты и векторы экспрессии, кодирующие рекомбинантные белки Env HIV по настоящему изобретению, можно получать с помощью любого способа, известного из уровня техники с учетом настоящего раскрытия. Например, нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный белок Env HIV, можно получать путем введения по меньшей мере одной из аминокислотных замен в указанные положения в каркасную последовательность белка оболочки HIV с применением

технологии генетической инженерии и методик молекулярной биологии, например, сайт-направленного мутагенеза, полимеразной цепной реакции (ПЦР) и т. д., которые хорошо известны специалистам в данной области. Затем молекулу нуклеиновой кислоты можно вводить или "клонировать" в вектор экспрессии также с применением стандартных методик молекулярной биологии. Затем рекомбинантный белок оболочки HIV может экспрессироваться с вектора экспрессии в клетке-хозяине, а экспрессированный белок очищают из культуры клеток с помощью любого способа, известного из уровня техники с учетом настоящего изобретения.

#### Тримерный комплекс

В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к тримерному комплексу, содержащему нековалентно связанный олигомер из трех рекомбинантных белков Env HIV согласно настоящему изобретению. Тримерный комплекс может содержать любой из рекомбинантных белков Env HIV, описанных в данном документе. Предпочтительно тримерный комплекс содержит три идентичных мономера (или три идентичных гетеродимера, если gp140 расщеплен) рекомбинантных белков Env HIV согласно настоящему изобретению. Тримерный комплекс можно отделять от других форм белка оболочки HIV, таких как мономерная форма, или тримерный комплекс может присутствовать вместе с другими формами белка оболочки HIV, такими как мономерная форма.

#### Композиции и способы

В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей рекомбинантный белок Env HIV, тримерный комплекс, выделенную нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяина и фармацевтически приемлемый носитель. Композиция может содержать любой из рекомбинантных белков Env HIV, тримерных комплексов, выделенных молекул нуклеиновой кислоты, векторов или клеток-хозяев, описанных в данном документе.

Носитель может включать одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, таких как связывающие вещества, разрыхлители, вещества, способствующие набуханию, суспендирующие средства, эмульгирующие средства, смачивающие средства, смазывающие вещества, ароматизаторы, подсластители, консерванты, красители, солюбилизаторы и покрытия. Точная природа носителя или другого материала может зависеть от пути введения, например, внутримышечного, внутрикожного, подкожного, перорального, внутривенного, чрескожного, чресслизистого (например, в кишечнике), интраназального или внутрибрюшинного путей. В случае жидких инъекционных препаратов, например, суспензий и растворов, подходящие носители и добавки включают воду, гликоли, масла, спирты, консерванты, красящие средства и т. п. В случае твердых препаратов для перорального введения, например, порошков, капсул, капсуловидных таблеток, желатиновых капсул и таблеток, подходящие носители и добавки включают разновидности крахмала, сахара, разбавители, гранулирующие средства, смазывающие вещества, связывающие вещества, разрыхлители

и т. п. В случае назальных спреев/смесей для ингаляции водный раствор/суспензия может содержать воду, гликоли, масла, смягчающие вещества, стабилизаторы, смачивающие средства, консерванты, душистые вещества, вкусоароматические добавки и т. п. в качестве подходящих носителей и добавок.

Для облегчения введения и увеличения эффективности композиции по настоящему изобретению можно составлять в любой форме, подходящей для введения субъекту, в том числе без ограничения в форме для перорального (энтерального) введения и парентеральных инъекций. Парентеральные инъекции включают внутривенную инъекцию или инфузию, подкожную инъекцию, внутрикожную инъекцию и внутримышечную инъекцию. Композиции по настоящему изобретению также можно составлять для других путей введения, в том числе для чресслизистого, глазного, ректального введения, введения посредством имплантата длительного действия, сублингвального введения, введения "под язык", введения через слизистую оболочку полости рта в обход portalного кровообращения, ингаляционного или интраназального введения.

Варианты осуществления настоящего изобретения также относятся к способам получения композиции. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения способ получения композиции предусматривает смешивание рекомбинантного белка Env HIV, тримерного комплекса, выделенной нуклеиновой кислоты, вектора или клетки-хозяина по настоящему изобретению с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. Среднему специалисту в данной области будут хорошо известны традиционные методики, применяемые для получения таких композиций.

Антигены HIV (например, белки или их фрагменты, происходящие из продуктов генов gag, pol и/или env HIV) и векторы, такие как вирусные векторы, обеспечивающие экспрессию антигенов HIV, ранее применяли в иммуногенных композициях и вакцинах для вакцинации субъекта против инфекции, вызываемой HIV, или для выработки у субъекта иммунного ответа на инфекцию, вызываемую HIV. Используемый в данном документе "субъект" означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека, которому будут вводить или вводили иммуногенную композицию согласно вариантам осуществления настоящего изобретения. Используемый в данном документе термин "млекопитающее" охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают без ограничения мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т. д., предпочтительно человека. Рекомбинантные белки Env HIV по настоящему изобретению также можно применять в качестве антигенов для индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (HIV) у субъекта, нуждающегося в этом. Иммунный ответ может вырабатываться против одной или нескольких клад HIV, таких как клада А, клада В, клада С и т. д. Композиции могут содержать вектор, с которого экспрессируется рекомбинантный белок Env HIV, или композиция может содержать выделенный рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

Например, композиции, содержащие рекомбинантный белок HIV или его

тримерный комплекс, можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом, для индукции у субъекта иммунного ответа против инфекции, вызываемой HIV. Композицию, содержащую вектор, такой как аденовирусный вектор, кодирующий рекомбинантный белок Env HIV по настоящему изобретению, где рекомбинантный белок Env HIV экспрессируется с помощью вектора, также можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом, для индукции у субъекта иммунного ответа против инфекции, вызываемой HIV. Способы, описанные в настоящем документе, также включают введение композиции по настоящему изобретению в комбинации с одним или несколькими дополнительными антигенами HIV (например, белками или их фрагментами, происходящими из продуктов генов gag, pol и/или env HIV), которые предпочтительно экспрессируются с одного или нескольких векторов, таких как аденовирусные векторы или векторы на основе MVA, в том числе способы примирования и усиления иммунного ответа.

В определенных вариантах осуществления белок Env HIV может быть представлен на частице, такой как липосома, вирусоподобная частица (VLP), наночастица, виросома или экзосома, необязательно в комбинации с эндогенными и/или экзогенными адъювантами. По сравнению с растворимым или мономерным белком Env самим по себе, такие частицы обычно проявляют повышенную эффективность презентации антигена *in vivo*.

Примеры VLP, которые представляют белок Env HIV, можно получать, например, с помощью совместной экспрессии белка Env HIV с самособирающимися вирусными белками, такими как коровий белки Gag HIV или белки Gag других ретровирусов. VLP сходны с вирусами, но не являются инфекционными, поскольку они не содержат вирусного генетического материала. Экспрессия вирусных структурных белков, таких как оболочка или капсид, может приводить к самосборке VLP. VLP хорошо известны специалисту, и их применение в вакцинах описано, например, в (Kushnir et al, 2012).

В определенных предпочтительных вариантах осуществления частица представляет собой липосому. Липосома представляет собой сферическую везикулу, имеющую по меньшей мере один липидный бислой. Например, тримерные белки Env HIV можно нековалентно связывать с такими липосомами за счет электростатических взаимодействий, например, путем добавления His-метки на С-конец тримера Env HIV и введения бивалентного хелатообразующего атома, такого как Ni<sup>2+</sup> или Co<sup>2+</sup>, в группу "головки" дериватизированных липидов в липосоме. В определенных неограничивающих и иллюстративных вариантах осуществления липосома содержит 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), холестерин и никелевую или кобальтовую соль 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-[(N-(5-амино-1-карбоксипентил)иминодиуксусной кислоты)сукцинила] (DGS-NTA(Ni<sup>2+</sup>) или DGS-NTA(Co<sup>2+</sup>)) в молярном соотношении 60:36:4. В предпочтительных вариантах осуществления тримерные белки Env HIV ковалентно связаны с поверхностью липосомы, например, посредством малеимидной функциональной группы, интегрированной в поверхность липосомы. В своих определенных неограничивающих иллюстративных вариантах осуществления липосома

содержит DSPC, холестерин и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[4-(*p*-малеимидометил)циклогексанкарбоксамид]липид в молярном соотношении 54:30:16. Белок Env HIV можно связать с ней, например, посредством добавленного С-концевого цистеина в белке Env HIV. Ковалентно связанные варианты являются более стабильными, вызывают образование высоких титров антигенспецифических IgG, а эпитопы на менее релевантной в антигенном отношении 'нижней части' тримера Env маскированы. Способы получения тримеров Env HIV, связанных с липосомами, а также их характеристика известны и были описаны, например, в (Bale et al, 2017), включенной посредством ссылки в данный документ. В настоящем изобретении также представлен белок Env HIV по настоящему изобретению, слитый с липосомой и/или представленный на ней.

В определенных вариантах осуществления белок Env HIV по настоящему изобретению слит с самособирающимися частицами или представлен на наночастицах. Антигенные наночастицы представляют собой сборки из полипептидов, которые презентуют множество копий антигенов, например, белок Env HIV по настоящему изобретению, что приводит к множеству сайтов связывания (авидности) и может обеспечивать улучшенную стабильность и иммуногенность антигена. Получение и применение самособирающихся белковых наночастиц для применения в вакцинах хорошо известно специалисту, см., например, (Zhao et al, 2014), (López-Sagasetta et al, 2016). В качестве неограничивающих примеров самособирающиеся наночастицы могут быть основаны на ферритине, бактериоферритине или DPS. Наночастицы на основе DPS, представляющие белки на своей поверхности, описаны, например, в WO2011/082087. Описание тримерных антигенов HIV-1 на таких частицах было описано, например, в (He et al, 2016). Другие самособирающиеся белковые наночастицы, а также их получение раскрыты, например, в WO 2014/124301 и US 2016/0122392, включенных в данный документ посредством ссылки. В настоящем изобретении также представлен белок Env HIV по настоящему изобретению, слитый с самособирающейся наночастицей и/или представленный на ней. В настоящем изобретении также представлены композиции, содержащие VLP, липосомы или самособирающиеся наночастицы согласно настоящему изобретению.

В определенных вариантах осуществления адъювант включают в композицию по настоящему изобретению или совместно вводят с композицией по настоящему изобретению. Применение адъюванта является необязательным, и он может дополнительно усиливать иммунные ответы, когда композицию применяют в целях вакцинации. Адъюванты, подходящие для совместного введения или включения в композицию согласно настоящему изобретению, предпочтительно должны быть такими, которые потенциально безопасны, хорошо переносятся и эффективны при применении у человека. Такие адъюванты хорошо известны специалисту, и неограничивающие примеры включают QS-21, Detox-PC, MPL-SE, MoGM-CSF, TiterMax-G, CRL-1005, GERBU, TERamide, PSC97B, Adjuvax, PG-026, GSK-I, GcMAF, В-алетин, MPC-026, Adjuvax, CpG ODN, бетафектин, соли алюминия, такие как фосфат алюминия (например, AdjuPhos) или

гидроксид алюминия, и MF59.

Также в данном документе раскрыты рекомбинантные белки оболочки HIV, содержащие аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, которые представляют консенсусную последовательность белка оболочки HIV клады C и консенсусную последовательность белка оболочки HIV клады B соответственно. Эти консенсусные последовательности не были обнаружены ни в каких встречающихся в природе последовательностях и, таким образом, полагают, что они являются новыми белками оболочки HIV. Рекомбинантный белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, необязательно может дополнительно содержать так называемые мутации SOSIP и/или мутацию в сайте расщепления фурином, такие как, например, в последовательностях, показанных под SEQ ID NO: 3, или SEQ ID NO: 3, дополнительно содержащей Pro в положении 558 и/или положении 556; и SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 5, дополнительно, содержащей Pro в положении 558 и/или положении 556. Когда для этих последовательностей определяют % идентичности, аминокислоты в мутированном сайте расщепления фурином и в положениях 501, 605, 559, 556 и 558 предпочтительно не принимают во внимание. Неожиданно было обнаружено, что такие белки экспрессируются на высоких уровнях и характеризуются высоким уровнем стабильности и образования тримеров. В определенных вариантах осуществления такие белки Env HIV можно применять в качестве каркасных белков, в которых можно осуществлять мутации по K658 по типу замены на V, I, F, M, A или L для получения молекулы по настоящему изобретению. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие данные последовательности, векторы, содержащие данные последовательности, функционально связанные с промотором, и композиции, содержащие белок, выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, также раскрыты.

#### ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Вариант осуществления 1 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV, который содержит в положении 658 аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Val, Ile, Phe, Met, Ala и Leu,

где нумерация положений соответствует нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1.

Вариант осуществления 2 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 1, где аминокислота в положении 658 представляет собой Val.

Вариант осуществления 3 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 1, где аминокислота в положении 658 представляет собой Ile.

Вариант осуществления 4 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV



согласно варианту осуществления 1, где аминокислота в положении 658 представляет собой Met.

Вариант осуществления 5 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 1, где аминокислота в положении 658 представляет собой Phe.

Вариант осуществления 6 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 1, где аминокислота в положении 658 представляет собой Ala.

Вариант осуществления 7 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 1, где аминокислота в положении 658 представляет собой Leu.

Вариант осуществления 8 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно любому из вариантов осуществления 1-7, дополнительно содержащий один или несколько из следующих аминокислотных остатков:

- (i) Phe, Leu, Met или Trp, предпочтительно Phe, в положении 651;
- (ii) Phe, Ile, Met или Trp, предпочтительно Ile, в положении 655;
- (iii) Asn или Gln, предпочтительно Asn, в положении 535;
- (iv) Val, Ile или Ala, предпочтительно Val или Ile, в положении 589;
- (v) Phe или Trp, предпочтительно Phe, в положении 573;
- (vi) Ile в положении 204; и
- (vii) Phe, Met или Ile, предпочтительно Phe, в положении 647,

где нумерация положений соответствует нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1.

Вариант осуществления 9 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 8, содержащий один или несколько из следующих аминокислотных остатков:

- (i) Phe, Leu, Met или Trp, предпочтительно Phe, в положении 651;
- (ii) Phe, Ile, Met или Trp, предпочтительно Ile, в положении 655;
- (iii) Asn или Gln, предпочтительно Asn, в положении 535;
- (iv) Val, Ile или Ala, предпочтительно Val или Ile, в положении 589;
- (vi) Ile в положении 204; и
- (vii) Phe, Met или Ile, предпочтительно Phe, в положении 647.

Вариант осуществления 10 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 9, содержащий Phe, Leu, Met или Trp в положении 651.

Вариант осуществления 11 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 10, содержащий Phe в положении 651.

Вариант осуществления 12 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 9, содержащий Phe, Ile, Met или Trp в положении 655.

Вариант осуществления 13 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 12, содержащий Ile в положении 655.

Вариант осуществления 14 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 9, содержащий Asn или Gln в положении 535.

Вариант осуществления 15 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 14, содержащий Asn в положении 535.

Вариант осуществления 16 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 9, содержащий Val, Ile или Ala в положении 589.

Вариант осуществления 17 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 16, содержащий Val в положении 589.

Вариант осуществления 18 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 16, содержащий Ile в положении 589.

Вариант осуществления 19 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 9, содержащий Ile в положении 204.

Вариант осуществления 20 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 9, содержащий Phe, Met или Ile в положении 647.

Вариант осуществления 21 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 20, содержащий Phe в положении 647.

Вариант осуществления 22 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 9, содержащий по меньшей мере два аминокислотных остатка из (i), (ii), (iii), (iv), (vi) и (vii).

Вариант осуществления 23 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 22, содержащий по меньшей мере три аминокислотных остатка из (i), (ii), (iii), (iv), (vi) и (vii).

Вариант осуществления 24 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 23, содержащий по меньшей мере четыре аминокислотных остатка из (i), (ii), (iii), (iv), (vi) и (vii).

Вариант осуществления 25 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 24, содержащий по меньшей мере пять аминокислотных остатков из (i), (ii), (iii), (iv), (vi) и (vii).

Вариант осуществления 26 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 25, содержащий все шесть указанных аминокислотных остатков из (i), (ii), (iii), (iv), (vi) и (vii).

Вариант осуществления 27 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 9, содержащий Val в положении 658 и Ile в положении 655.

Вариант осуществления 28 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 9, содержащий Val в положении 658 и Phe в положении 651.

Вариант осуществления 29 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 9, содержащий Ile в положении 658 и Ile в положении 655.

Вариант осуществления 30 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 9, содержащий Ile в положении 658 и Phe в положении 651.

Вариант осуществления 31 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 9, содержащий Val в положении 658 и Phe в положении 655.

Вариант осуществления 32 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно любому из вариантов осуществления 27, 29 или 31, дополнительно содержащий Phe в положении 651.

Вариант осуществления 33 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно любому из вариантов осуществления 1-32, где Env HIV получен из HIV клады C.

Вариант осуществления 34 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно любому из вариантов осуществления 1-33, содержащий исходную молекулу Env HIV, которая была подвергнута мутации по одному или нескольким из указанных положений с получением указанного аминокислотного остатка в указанном одном или нескольких положениях, где исходная молекула имеет консенсусную последовательность Env HIV.

Вариант осуществления 35 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно любому из вариантов осуществления 1-33, содержащий исходную молекулу Env HIV, которая была подвергнута мутации по одному или нескольким из указанных положений с получением указанного аминокислотного остатка в указанном одном или нескольких положениях, где исходная молекула представляет собой синтетический белок Env.

Вариант осуществления 36 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно любому из вариантов осуществления 1-33, содержащий исходную молекулу Env HIV, которая была подвергнута мутации по одному или нескольким из указанных положений с получением указанного аминокислотного остатка в указанном одном или нескольких положениях, где исходная молекула представляет собой белок Env HIV дикого типа, предпочтительно из клады C, содержащий по меньшей мере одну восстанавливающую мутацию по аминокислотному остатку, который присутствует в соответствующем положении с частотой, составляющей менее 7,5%, предпочтительно менее 2% последовательностей Env HIV в совокупности из по меньшей мере 100, предпочтительно по меньшей мере 1000, предпочтительно по меньшей мере 10000 последовательностей Env HIV дикого типа, где восстанавливающая мутация представляет собой замену на аминокислотный остаток, который присутствует в соответствующем положении с частотой, составляющей по меньшей мере 10% последовательностей Env HIV в указанной совокупности, и предпочтительно восстанавливающая мутация представляет собой замену на аминокислотный остаток, который наиболее часто присутствует в соответствующем положении в указанной совокупности.

Вариант осуществления 37 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV

согласно любому из вариантов осуществления 1-36, дополнительно содержащий Cys в положениях 501 и 605 или Pro в положении 559, предпочтительно Cys в положениях 501 и 605 и Pro в положении 559.

Вариант осуществления 38 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 36, содержащий Cys в положениях 501 и 605 и Pro в положении 559.

Вариант осуществления 39 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно любому из вариантов осуществления 1-38, дополнительно предусматривающий один или несколько из следующего:

(viii) Gln, Glu, Ile, Met, Val, Trp или Phe, предпочтительно Gln или Glu, в положении 588;

(ix) Lys в положении 64 или Arg в положении 66, или как Lys в положении 64, так и Arg в положении 66;

(x) Trp в положении 316;

(xi) Cys в обоих из положений 201 и 433;

(xii) Pro в положении 556 или 558 или в обоих из положений 556 и 558;

(xiii) замещения петли в положениях аминокислот 548-568 (HR1-петля) петель, имеющей 7-10 аминокислот, предпочтительно петель из 8 аминокислот, например, имеющей последовательность, выбранную из любой из (SEQ ID NO: 12-17);

(xiv) Gly в положении 568, или Gly в положении 569, или Gly в положении 636, или Gly в обоих из положений 568 и 636, или Gly в обоих из положений 569 и 636; и/или

(xv) Tyr в положении 302, или Arg в положении 519, или Arg в положении 520, или Tyr в положении 302 и Arg в положении 519, или Tyr в положении 302 и Arg в положении 520, или Tyr в положении 302 и Arg в обоих из положений 519 и 520.

Вариант осуществления 40 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 39, содержащий Pro в положении 556.

Вариант осуществления 41 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 39, содержащий Pro в положении 558.

Вариант осуществления 42 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 39, содержащий Pro в положениях 556 и 558.

Вариант осуществления 43 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно любому из вариантов осуществления 1-42, дополнительно содержащий мутацию в сайте расщепления фурином белка Env HIV.

Вариант осуществления 44 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 43, где мутация в сайте расщепления фурином предусматривает замещение в положениях 508-511 на RRRRRR (SEQ ID NO: 10).

Вариант осуществления 45 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно любому из вариантов осуществления 1-44, который представляет собой белок gp140 или gp160.

Вариант осуществления 46 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV

согласно варианту осуществления 45, который представляет собой белок gp140.

Вариант осуществления 47 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно любому из вариантов осуществления 1-46, где рекомбинантный белок Env HIV характеризуется по меньшей мере одним параметром из (a) увеличенной процентной доли образования тримеров и (b) увеличенного выхода тримеров по сравнению с другим белком Env HIV, идентичным за исключением того, что он содержит Lys в положении 658.

Вариант осуществления 48 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно варианту осуществления 47, где образование тримеров измеряется с помощью эксклюзионной хроматографии в сочетании с многоугловым светорассеянием (SEC-MALS).

Вариант осуществления 49 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно любому из вариантов осуществления 1-48, содержащий, в дополнение к V, I, F, M, A или L в положении 658, комбинацию аминокислот, выбранную из группы, состоящей из:

- (a) 655I, 589V, 573F, 651F, 588E, 535N, 204I;
- (b) 556P, 655I, 535N, 573F, 589V, 204I, 588Q;
- (c) 204I, 535N, 556P, 588E, 589V, 651F, 655I;
- (d) 535N, 556P, 589V, 651F, 655I; и
- (e) 535N, 556P, 588E, 589V, 651F, 655I.

Вариант осуществления 50 представляет собой рекомбинантный белок Env HIV согласно любому из вариантов осуществления 1-49, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентична любой из SEQ ID NO: 3, 5, 20, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32, предпочтительно на по меньшей мере 98% идентична любой из SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32 или на 100% идентична любой из SEQ ID NO: 29, 30 или 31.

Вариант осуществления 51 представляет собой тримерный комплекс, содержащий нековалентно связанный олигомер из трех рекомбинантных белков Env HIV согласно любому из вариантов осуществления 1-50.

Вариант осуществления 52 представляет собой частицу, например, липосому или наночастицу, например, самособирающуюся наночастицу, представляющую рекомбинантный белок Env HIV согласно любому из вариантов осуществления 1-50 или тримерный комплекс согласно варианту осуществления 51.

Вариант осуществления 53 представляет собой выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный белок Env HIV согласно любому из вариантов осуществления 1-50.

Вариант осуществления 54 представляет собой вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты согласно варианту осуществления 53, функционально связанную с промотором.

Вариант осуществления 55 представляет собой вектор согласно варианту

осуществления 54, который является аденовирусным вектором.

Вариант осуществления 56 представляет собой клетку-хозяина, содержащую выделенную молекулу нуклеиновой кислоты согласно варианту осуществления 53 или вектор согласно вариантам осуществления 54 или 55.

Вариант осуществления 57 представляет собой способ получения рекомбинантного белка Env HIV, предусматривающий выращивание клетки-хозяина согласно варианту осуществления 56 в условиях, подходящих для получения рекомбинантного белка Env HIV.

Вариант осуществления 58 представляет собой способ получения рекомбинантного белка Env HIV, предусматривающий получение вектора экспрессии, содержащего выделенную нуклеиновую кислоту согласно варианту осуществления 53, функционально связанную с промотором; осуществление трансфекции клетки с помощью вектора экспрессии; выращивание трансфицированной клетки в условиях, подходящих для экспрессии рекомбинантного белка Env HIV; и очистку рекомбинантного белка Env HIV в условиях, которые обеспечивают образование стабилизированного тримерного комплекса.

Вариант осуществления 59 представляет собой способ получения рекомбинантного белка Env HIV согласно любому из вариантов осуществления 1-50, включающий введение аминокислотной замены в каркасную последовательность белка оболочки HIV в положение 658, в результате чего полученная аминокислота в этом положении представляет собой Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu, предпочтительно Val или Ile, наиболее предпочтительно Val.

Вариант осуществления 60 представляет собой способ согласно варианту осуществления 59, где нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную замену, вводят в нуклеиновую кислоту, кодирующую каркасную последовательность белка оболочки HIV.

Вариант осуществления 61 представляет собой способ согласно вариантам осуществления 59 или 60, где каркасная последовательность белка оболочки HIV выбрана из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; и

белка Env HIV дикого типа, имеющего мутации, которые приводят к по меньшей мере (a), (b) или (c), предпочтительно к по меньшей мере двум из (a), (b) и (c), наиболее предпочтительно к (a), (b) и (c) из следующего:

(a) Cys в положениях 501 и 506 и Pro в положении 559,

(b) замещению на SEQ ID NO: 10 аминокислот 508-511, и/или

(c) по меньшей мере одной восстанавливающей мутации по аминокислотному остатку, который присутствует в соответствующем положении с частотой, составляющей менее 7,5%, предпочтительно менее 2% последовательностей Env HIV в совокупности из по меньшей мере 100, предпочтительно по меньшей мере 1000, предпочтительно по меньшей мере 10000 последовательностей Env HIV дикого типа, где восстанавливающая мутация представляет собой замену на аминокислотный остаток, который присутствует в

соответствующем положении с частотой, составляющей по меньшей мере 10% последовательностей Env HIV в указанной совокупности, и предпочтительно восстанавливающая мутация представляет собой замену на аминокислотный остаток, который наиболее часто присутствует в соответствующем положении в указанной совокупности.

Вариант осуществления 62 представляет собой композицию, содержащую рекомбинантный белок Env HIV согласно любому из вариантов осуществления 1-50, тримерный комплекс согласно варианту осуществления 51, частицу согласно варианту осуществления 52, выделенную молекулу нуклеиновой кислоты согласно варианту осуществления 53 или вектор согласно вариантам осуществления 54 или 55 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 63 представляет собой композицию согласно варианту осуществления 62, дополнительно содержащую адъювант.

Вариант осуществления 64 представляет собой способ получения композиции согласно варианту осуществления 62, предусматривающий смешивание рекомбинантного белка Env HIV, тримерного комплекса, частицы, выделенной нуклеиновой кислоты или вектора с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями.

Вариант осуществления 65 представляет собой способ вакцинации субъекта против инфекции, вызываемой HIV, предусматривающий введение субъекту композиции, содержащей рекомбинантный белок оболочки HIV согласно любому из вариантов осуществления 1-50, тримерный комплекс согласно варианту осуществления 51, частицу согласно варианту осуществления 52, выделенную нуклеиновую кислоту согласно варианту осуществления 53 или вектор согласно вариантам осуществления 54 или 55.

Вариант осуществления 66 представляет собой способ выработки иммунного ответа против инфекции, вызываемой HIV, у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий введение субъекту композиции, содержащей рекомбинантный белок оболочки HIV согласно любому из вариантов осуществления 1-50, тримерный комплекс согласно варианту осуществления 51, частицу согласно варианту осуществления 52, выделенную нуклеиновую кислоту согласно варианту осуществления 53 или вектор согласно вариантам осуществления 54 или 55.

Вариант осуществления 67 представляет собой частицу согласно варианту осуществления 52, где частица представляет собой липосому.

Вариант осуществления 68 представляет собой частицу согласно варианту осуществления 52, где частица представляет собой самособирающуюся наночастицу.

## ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение консенсусной последовательности белка оболочки HIV клады С и клады В

Консенсусная последовательность белка оболочки HIV клады С

Консенсусную последовательность белка оболочки (Env) HIV клады С разрабатывали в качестве каркасной последовательности для исследования эффектов

различных мутаций на образование тримеров белков Env HIV. Выравнивание последовательностей для 3434 последовательностей белка оболочки, полученных из известных вирусных изолятов HIV, загружали из базы данных Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>). Из 3434 последовательностей выбирали только 1252 последовательности клады С для получения консенсусной последовательности белка Env HIV клады С. В положениях, для которых нельзя было четко идентифицировать консенсусный остаток на основании выравнивания, консенсусную последовательность применяли для идентификации наиболее близких последовательностей дикого типа с помощью поиска BLAST. Консенсусный остаток в этих положениях выбирали затем как аминокислоту в наиболее близких последовательностях дикого типа, идентифицированных в результате поиска BLAST. Консенсусная последовательность белка Env HIV клады С показана под SEQ ID NO: 2.

Консенсусную последовательность белка Env HIV клады С дополнительно модифицировали путем введения так называемых мутаций SOSIP, которые включают остатки цистеина в положениях 501 и 605 и остаток пролина в положении 559, а также оптимизации сайта расщепления фурином путем замещения остатков 508-511 в сайте расщепления фурином на 6 остатков аргинина. Кроме того, Val в положении 295 мутировали с заменой на Asn (V295N) для создания сайта N-сцепленного гликозилирования, присутствующего у большинства штаммов HIV, и он может улучшать связывание с определенными антителами, применяемыми в некоторых экспериментах. В дополнение, С-конец усекали по остатку 664, что приводило к последовательности, кодирующей растворимый белок gp140 HIV. Все положения замены/модификации, описанные выше, приведены относительно нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1. Полученная последовательность gp140 HIV, обозначаемая "ConC\_SOSIP," показана под (SEQ ID NO: 3). Последовательность ConC\_SOSIP применяли в качестве каркасной или исходной последовательности белка оболочки HIV, в которую вводили дополнительные мутации, например, одиночные и двойные аминокислотные замены, с получением рекомбинантных белков Env HIV, описанных в данном документе.

Консенсусная последовательность белка оболочки HIV клады В

Консенсусную последовательность белка Env HIV клады В получали с применением процедуры, аналогичной описанной выше для получения консенсусной последовательности белка Env HIV клады С. Консенсусную последовательность белка клады В получали с применением 1708 последовательностей белка оболочки клады В из известных вирусных изолятов клады В. Консенсусная последовательность белка Env HIV клады В показана под SEQ ID NO: 4.

Консенсусную последовательность Env HIV клады В дополнительно модифицировали путем введения так называемых мутаций SOSIP, оптимизации сайта расщепления фурином за счет замещения сайта расщепления фурином на 6 остатков аргинина и усекания С-конца по остатку 664, как описано выше, что привело к последовательности, кодирующей консенсусную последовательность растворимого gp140



HIV клады В. Полученная последовательность белка Env gp140 HIV, обозначаемая "ConB\_SOSIP", показана под (SEQ ID NO: 5).

Было обнаружено, что молекулы на основе консенсусной последовательности характеризовались увеличенными уровнями экспрессии по сравнению с молекулами на основе природных изолятов и, более того, уже характеризовались увеличенными уровнями тримеризации.

#### Пример 2. Экспрессия и очистка рекомбинантного белка Env HIV

Рекомбинантные белки Env HIV экспрессировали и очищали в виде растворимых белков gp140. Одиночные мутации (аминокислотные замены) и их комбинации (например, двойные и тройные мутации) вводили в каркасную консенсусную последовательность ConC\_SOSIP для получения серии вариантов рекомбинантного белка Env HIV.

#### Получение и экспрессия конструкций и вариантов белка Env gp140 HIV

ДНК, кодирующую консенсусную последовательность белка Env HIV клады С, ConC\_SOSIP, показанную под SEQ ID NO: 3, синтезировали и подвергали оптимизации кодонов на GenScript (Пискатауэй, Нью-Джерси 08854) или Gene Art (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния). Затем подвергнутую оптимизации кодонов последовательность клонировали в вектор pcDNA2004 с получением конструкции белка Env gp140 HIV клады С, которую применяли в качестве каркасной последовательности белка оболочки HIV для введения дополнительных мутаций. Мутации вводили с каркасную последовательность ConC\_SOSIP за счет сайт-направленного мутагенеза и полимеразной цепной реакции (ПЦР), проводимых в отношении конструкции белка gp140 Env HIV клады С в pcDNA2004. Клетки HEK-Expi293F или клетки HEK293F подвергали транзientной трансфекции с помощью 90% вектора pcDNA2004, кодирующего последовательность ConC\_SOSIP или ее вариант, и 10% вектора pcDNA2004, кодирующего фуринпротеазу (фурин-pcDNA2004), в соответствии с инструкциями производителя. Трансфицированные клетки культивировали в течение 5 дней при 37°C и 10% CO<sub>2</sub>. Супернатанты культуры центрифугировали в течение 10 минут при 1250 x g. Впоследствии подвергнутый центрифугированию супернатант подвергали стерильной фильтрации с применением вакуумного фильтра с размером пор 0,22 мкм и хранили при 4°C до дальнейшего применения.

Для процедур экспрессии в 96-луночном формате клетки культивировали в течение 3 дней при 37°C и 10% CO<sub>2</sub>. 4 мкл Optimem (среда для культивирования) смешивали с 4 мкл 100 нг/мкл ДНК, добавляли 8 мкл смеси Expi293F (54 мкл/мл в Optimem) и инкубировали в течение 20 минут. Впоследствии добавляли по 200 мкл/луночка клеток Expi293F при плотности 2,5×10<sup>6</sup> клеток/мл. Супернатант культуры собирали и центрифугировали в течение 5 минут при 300 g для удаления клеток и клеточного дебриса. Подвергнутый центрифугированию супернатант впоследствии подвергали стерильной фильтрации с применением вакуумного фильтра с размером пор 0,22 мкм и хранили при 4°C до дальнейшего применения.

### Очистка белка Env gp140 HIV

Белок Env gp140 HIV, экспрессированный с вектора pcDNA2004, очищали согласно двухэтапному протоколу очистки с применением колонки с лектином из *Galantus nivalis* (Vectorlabs, AL-1243) для первоначальной очистки и колонки Superdex200 Increase (GE) на следующем этапе для удаления остаточных примесей. Для первоначального этапа с применением колонки с лектином из *Galantus nivalis* супернатант культуры разбавляли буфером (40 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5) и пропускали через колонку CV Tricorn 10-50, содержащую 4 мл агарозы с лектином, при скорости потока 4 мл в минуту. Впоследствии колонку промывали буфером в количестве четырех объемов колонки (40 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5) и элюировали с помощью 40 mM Tris, 500 mM NaCl и 1 М маннопиранозида, pH 7,5, в количестве четырех объемов колонки при скорости восходящего потока 1,6 мл/мин., что означает, что направление потока было изменено с нисходящего на восходящий для увеличения скорости элюирования белка оболочки и уменьшения объема элюирования. Элюат концентрировали с применением концентратора-центрифуги (50K, Amicon Ultra, Millipore).

Белок Env gp140 HIV дополнительно очищали на колонке Superdex200 с помощью 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4, в качестве подвижного буфера. Второй пик, который элюировался из колонки, содержал белок Env gp140 HIV. Фракции, содержащие этот пик, объединяли, а идентичность пика в качестве белка Env gp140 HIV подтверждали с применением вестерн-блоттинга и анализа SDS-PAGE и/или SEC-MALS. Концентрацию очищенного белка Env gp140 HIV определяли путем измерения оптической плотности при 280 нм, и очищенный белок Env gp140 HIV хранили при 4°C до дальнейшего применения.

### Анализ SDS-PAGE и вестерн-блоттинг

Супернатанты культуры клеток, содержащие экспрессированный белок Env gp140 HIV, и образцы очищенного белка Env gp140 HIV анализировали на гелях 4-12% (вес/об.) Bis-Tris NuPAGE, 1X MOPS (Life Technologies) в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях и проводили блоттинг с помощью технологии iBlot (Life Technologies). Все процедуры проводили в соответствии с инструкциями производителя. В случае анализа чистоты гели окрашивали инфракрасным белковым красителем Krypton (Thermo Scientific) или белковым красителем SYPRO Rubi (Bio-Rad). В случае анализа вестерн-блоттинг мембраны исследовали с помощью антитела к бх-гистиридиновой метке (антитело к His, конъюгированное с HRP). Гели и блот-мембраны сканировали на приборе Odyssey (Li-Cor), а изображения анализировали с применением программного обеспечения Odyssey 3.0 (Li-Cor).

Пример 3. Скрининг вариантов рекомбинантного белка Env gp140 HIV в отношении выхода тримеров и процентной доли образования тримеров

Варианты рекомбинантного белка Env HIV, полученные в примере 2, подвергали скринингу в отношении образования тримеров для идентификации тех мутаций, которые увеличивали процентную долю образованного тримера и/или увеличивали показатели выхода тримеров по сравнению с каркасной последовательностью ConC\_SOSIP.

Высокопроизводительный скрининг процентной доли образования тримеров и показателей выхода тримеров проводили с применением анализа AlphaLISA для оценки связывания панели нейтрализующих HIV антител широкого спектра действия (bNAb) и отличных от bNAb антител с рекомбинантными белками Env HIV. Результаты анализа AlphaLISA подтверждали с помощью эксклюзионной хроматографии и многоуглового светорассеяния (SEC-MALS).

#### Исследование с помощью анализа AlphaLISA®

Общую экспрессию белка Env gp140 HIV и общее количество правильно свернутого нативного тримера у более 200 вариантов gp140 HIV с одиночными аминокислотными заменами, введенными в последовательность ConC\_SOSIP, полученную, как описано в примере 2, измеряли в супернатанте культуры клеток с помощью анализа AlphaLISA. Также тестировали варианты gp140 HIV, содержащие двойные и тройные мутации. Для сравнения тестировали белок Env HIV, имеющий последовательность ConC\_SOSIP без каких-либо дополнительных мутаций.

Для анализа применяли, среди прочего, следующие моноклональные антитела (mAb): mAb PGT145, mAb PGDM1400, mAb PG16, mAb PGT151, mAb 35O22, mAb PGT128, mAb PG9, mAb F105, mAb B6, mAb 447-52d, mAb 14e и mAb 17b. MAb 447-52D (AB014), PG9 (AB015) и PG16 (AB016) приобретали у Polymun Scientific Immunbiologische Forschung GmbH (Клостернойбург, Австрия). Ненейтрализующее антитело b6 получили от Dennis R. Burton (Научно-исследовательский институт Скриппса, Ла-Хойя, Калифорния), а ненейтрализующее антитело 14e получили от James E. Robinson (Университет Тулейн, Новый Орлеан, Луизиана). В случае mAb PGT145 (PDB: 3U1S), PGDM1400 (PDB: 4RQQ), PGT151 (PDB: 4NUG), 35O22 (PDB: 4TVP), F105 (PDB: 1U6A), PGT128 (PDB: 3TYG) и 17b (PDB: 4RQS) в вектор экспрессии клонировали нуклеиновые кислоты, кодирующие опубликованные последовательности, и их получали для оценки белков Env HIV. За исключением mAb F105, B6, 447-52d, 14e и 17b, антитела, применяемые для анализа, представляют собой нейтрализующие антитела широкого спектра действия (bNAb). bNAb способны к нейтрализации нескольких вирусных штаммов HIV. Среди bNAb, антитела PGT145, PGDM1400 и PG16 связываются с вершиной тримера и являются тримерспецифическими. PGT151 также является тримерспецифическим, но связывается на границе двух протомеров gp120 и gp41 и является зависимым от расщепления. Связывание отличных от bNAb антител является показателем неправильного сворачивания или открытой конформации тримера.

Сворачивание белка также тестировали путем измерения связывания вариантов растворимого белка Env gp140 HIV с антителом (mAb 17b), которое, как известно, связывается с сайтом связывания корцептора белка оболочки HIV, который становится доступным только после связывания CD4 (данные не показаны). В частности, для оценки индуцированного CD4 изменения конформации применяли растворимый рецептор CD4 (sCD4) в комбинации с mAb 17. Связывание mAb 17b с вариантом белка Env gp140 HIV без предварительного связывания CD4 с белком оболочки является показателем частично

развернутого или предварительно активированного белка оболочки (т. е. нестабильного Env, который принимает "открытую" конформацию в отсутствие связывания с CD4).

Для анализа AlphaLISA получали конструкции Env gp140 HIV в векторе pcDNA2004, содержащем линкер, за которым следует метка на основе сортазы A, за которой следует Flag-метка, за которой следует гибкий (G4S)<sub>7</sub> линкер и который оканчивается His-меткой (последовательность метки, которую помещали на С-конец белка Env HIV, представлена под SEQ ID NO: 19). Конструкции Env gp140 HIV экспрессировали в клетках HEK-Expi293, которые культивировали в течение трех дней в 96-луночных планшетах (200 мкл/лунка). Неочищенные супернатанты разбавляли в 120 раз в буфере AlphaLISA (PBS+0,05% Tween-20+0,5 мг/мл BSA). В случае анализов на основе mAb 17b супернатанты разбавляли в 12 раз. Потом 10 мкл каждого разбавления переносили в 96-луночный планшет и смешивали с 40 мкл акцепторных гранул, донорных гранул и одного из вышеперечисленных mAb. Донорные гранулы конъюгировали с ProtA (№ по кат.: AS102M, лот №1831829, Perkin Elmer), который связывается с mAb. Акцепторные гранулы конъюгировали с антителом к His (№ кат.: AL128M, Perkin Elmer), которое связывается с His-меткой конструкции. Для количественного определения общего выхода белка, включая все формы белка оболочки, применяли комбинацию из конъюгированных с никелем донорных гранул (№ по кат.: AS101M, Perkin Elmer) для выявления His-метки вместе с конъюгированными с антителом к Flag акцепторными гранулами (№ кат.: AL112R, Perkin Elmer) для выявления Flag-метки. Для тестов с применением mAb 17b в комбинации с sCD4-His применяли комбинацию донорных гранул с ProtA и акцепторных гранул с антителом к Flag (данные не показаны). Один образец смешивали с донорными и акцепторными гранулами для выявления образования тримеров, а второй образец того же варианта Env смешивали с конъюгированными с никелем донорными гранулами и конъюгированной с антителом к Flag акцепторной гранулой для измерения общего количества экспрессированного белка (т. е. общего выхода белка).

Смесь супернатанта, содержащего экспрессированный белок Env gp140 HIV, mAb, донорных гранул и акцепторных гранул инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов без встряхивания. Впоследствии с помощью прибора для считывания планшетов Synergy NEO измеряли хемилюминесцентный сигнал (BioTek). Средний фоновый сигнал, присущий ложнотрансфицированным клеткам, вычитали из значений AlphaLISA, измеренных для каждого из вариантов Env gp140 HIV. Затем сигналы всего набора данных делили на сигнал, измеренный для белка Env HIV, имеющего каркасную последовательность ConC\_SOSIP, для нормализации сигнала для каждого из протестированных вариантов Env gp140 HIV относительно каркасной последовательности. Для определения процентной доли образования тримеров и выхода тримеров для каждого из вариантов применяли данные связывания каждого из вариантов Env gp140 HIV с тримерспецифическим mAb PGT145. Связывание с другими mAb применяли для оценки общего паттерна связывания вариантов Env HIV с bNAbs и

отличными от bNAb антителами (не показано).

Процентную долю образования тримеров для каждого из вариантов Env HIV рассчитывали путем деления нормализованного хемилюминесцентного сигнала, полученного от исследуемой смеси из варианта Env HIV, mAb PGT145, конъюгированных с ProtA донорных гранул и конъюгированных с антителом к His акцепторных гранул, на нормализованный хемилюминесцентный сигнал, полученный от исследуемой смеси из варианта Env HIV, конъюгированных с антителом к His донорных гранул и конъюгированных с антителом к Flag акцепторных гранул.

Выход тримеров для каждого из вариантов Env HIV определяли относительно выхода тримеров для белка Env HIV, имеющего каркасную последовательность ConC\_SOSIP без каких-либо дополнительных мутаций. Нормализованный хемилюминесцентный сигнал, полученный в результате связывания mAb PGT145 с белком оболочки ConC\_SOSIP считали равным 1, и нормализованный хемилюминесцентный сигнал, полученный от связывания mAb PGT145 с каждым из белков HIV gp140 нормализовали относительно данного значения.

Результаты исследования с помощью анализа AlphaLISA - процентная доля тримеров и показатели выхода тримеров

Процентная доля образования тримеров, определенная с помощью анализа AlphaLISA для некоторых одиночных, двойных и тройных аминокислотных замен из перечня (i) - (vii) в таблице 1 выше в каркасной последовательности ConC\_SOSIP, показана на ФИГ. 2А. На основании приблизительно 200 протестированных вариантов Env gp140 HIV, содержащих одиночные аминокислотные замены, идентифицировали семь положений замены, в случае которых процентная доля образовавшегося тримера повышалась на по меньшей мере 25% относительно процентной доли образовавшегося тримера в случае каркасной последовательности ConC\_SOSIP без каких-либо дополнительных аминокислотных замен.

Результаты, показанные на ФИГ. 2А, демонстрируют, что семь предпочтительных положений замены, при которых наблюдали значительное повышение процентной доли образования тримеров, включают N651, K655, I535, D589, I573, A204 и E647 согласно нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1. В частности, одиночные аминокислотные замены, которые приводили к наибольшему увеличению процентной доли образования тримеров, включали N651F, K655I(F/W) (однако, был также один эксперимент, в котором K655F, по-видимому, не приводила к улучшению), I535N, D589V(A), I573F, A204I, E647F. Некоторые мутации, которые тестировали в комбинации с некоторыми из данных мутаций, включали K588Q/E, I556P и A558P, и они дополнительно увеличивали процентную долю образования тримеров у мутантов с предпочтительными аминокислотами в положениях (i) - (vii) таблицы 1 в данном эксперименте.

Все двойные замены, протестированные в данном эксперименте, характеризовались более высокой процентной долей образования тримеров, чем соответствующие одиночные замены, а все протестированные тройные замены

характеризовались более высокой процентной долей образования тримеров, чем соответствующие одиночные и двойные мутации (ФИГ. 2А). Такие непредвиденные и неожиданные результаты указывают на то, что данные мутации могли проявлять в данных экспериментах форму синергии с точки зрения тримеризации белка оболочки.

В дополнение к увеличенной процентной доле образования тримеров также оптимальным является увеличенный выход тримеров. Таким образом, с помощью анализа AlphaLISA также определяли выход тримеров вариантов HIV gp140, содержащих одиночные, двойные и тройные мутации в каркасной последовательности ConC\_SOSIP. Результаты показаны на ФИГ. 2В. Большинство вариантов gp140 HIV, содержащих одиночные мутации (исключение составляли I535N, D589A и D589I), характеризовались более высоким выходом тримеров, чем белок оболочки ConC\_SOSIP. Однако более точный анализ SEC-MALS мутанта I535N, описываемого ниже, показал увеличение выхода тримеров. Более того, дополнительные мутации в комбинации с I535N, такие как D589V, приводили к такому же выходу тримеров, который наблюдался в случае белка оболочки, имеющего такую конкретную дополнительную замену в отсутствие мутации I535N. Выход тримеров вариантов с двойными мутациями также увеличивался, при этом каждый из вариантов одиночных мутаций характеризовался более высоким выходом тримеров, чем белок оболочки ConC\_SOSIP (ФИГ. 2В).

Также тестировали процентную долю образования тримеров у вариантов HIV gp140 с двойными мутациями в каркасной последовательности ConC\_SOSIP, которые ранее были описаны в литературе, в том числе двойная замена E64K, T316W, описанная (De Taeye et al., выше), и дисульфидная двойная замена I204C, A433C, описанная (Kwon et al., выше). Двойная замена E64K, T316W приводила к более низкой процентной доле образования тримеров, чем белок оболочки ConC\_SOSIP, т. е. 15% (данные не показаны). Хотя дисульфидная двойная замена I204C, A433C повышала процентную долю тримеров до 43% (данные не показаны), двойные замены, описанные в данном документе, такие как I535N/K588E, K588Q/D589V, K655I/K588E, I535N/D589V, I535N/E647F, D589V/K655I и I535N/K655I (ФИГ. 2А) приводили к еще большей процентной доле образования тримеров в эксперименте с применением AlphaLISA.

В каркасную последовательность ConC\_SOSIP также вводили дополнительные мутации (пролин в остатках 558 и/или 556), и для этих белков Env gp140 HIV измеряли процентную долю образования тримеров и выход тримеров. Как одиночные замены на Pro в положении 558 или 556, так и двойная замена на пролин в обоих из положений 556 и 558 в дополнение к мутациям SOSIP, уже содержащимся в каркасной последовательности ConC\_SOSIP (т. е. Cys в положениях 501 и 605 и Pro в положении 559), повышали процентную долю образования тримеров и выход тримеров (данные не показаны). Действительно, введение одной или нескольких из новых стабилизирующих замен аминокислот по настоящему изобретению в каркасную последовательность ConC\_SOSIP, дополнительно содержащую остатки Pro в положениях 558 и/или 556, дополнительно увеличивает процентную долю образования тримеров и/или выход тримеров (например,

фиг. 2А, например, A558P/I535N, K655I/L556P, и несколько тройных мутантов, включающих мутацию A558P).

Данные связывания вариантов Env gp140 HIV с другими bNAbs и отличными от bNAbs антителами продемонстрировали, что большинство протестированных вариантов с одиночной, двойными и тройными мутациями, которые повышали выход тримеров и процентную долю образования тримеров, таких как перечисленные на ФИГ. 2А и 2В, также характеризовались повышенным связыванием с bNAbs и аналогичным или сниженным связыванием с отличными от bNAbs антителами относительно величины связывания, наблюдаемого у bNAbs и отличных от bNAbs антител в случае белка оболочки HIV, имеющего каркасную последовательность ConC\_SOSIP (данные не показаны). Для разработки вакцины предпочтительным является повышенное связывание с bNAbs и сниженное связывание с отличными от bNAbs антителами. Таким образом, данные демонстрируют, что белки оболочки HIV, содержащие аминокислотные замены в положениях (i) - (vii), указанных в таблице 1 выше, характеризуются оптимальными свойствами с точки зрения паттернов связывания с нейтрализующими антителами широкого спектра действия и нейтрализующими антителами, отличными от антител широкого спектра действия.

#### Анализ SEC-MALS

Для подтверждения выхода тримеров и процентной доли образования тримеров в случае вариантов gp140 HIV, подвергнутых скринингу с помощью анализа AlphaLISA, также применяли анализ SEC-MALS. Варианты gp140 HIV экспрессировали в культурах объемом 30 мл и очищали путем внесения не содержащих клеток супернатантов на 200 мкл гранул с лектином из *Galanthus nivalis* (Vectorlab, № по кат. AL-1243) в колонках с гравитационным током Polyprep (Biorad, № по кат. 731-1550). Гранулы промывали с помощью 2 мл буфера для связывания (40 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,4). Белки элюировали с применением 250-500 мкл 40 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 M маннопиранозида, pH 7,4. Для проведения эксперимента SEC-MALS применяли систему для высокоэффективной жидкостной хроматографии (Agilent Technologies) и прибор MiniDAWN TREOS (Wyatt), сопряженный с детектором показателя преломления Optilab T-rEX (Wyatt). В целом, в колонку TSK-Gel G3000SWxl (Tosoh Bioscience), уравновешенную с помощью подвижного буфера (150 mM фосфат натрия, 50 mM NaCl, pH 7,0) при 1 мл/мин, вносили либо 100 мкл элюата после очистки лектином, либо примерно 30 мкг белка. Данные анализировали с применением пакета программного обеспечения Astra 6, а расчеты молекулярного веса производили на основе сигнала показателя преломления.

Хроматограммы SEC-MALS белка оболочки ConC\_SOSIP и вариантов gp140 HIV, содержащих одиночные мутации, показаны на ФИГ. 3. В целом результаты, полученные с помощью анализа SEC-MALS, были сравнимыми и согласовывались с результатами, полученными с помощью анализа AlphaLISA. Хроматограмма белка оболочки ConC\_SOSIP имеет четыре основных пика, при этом второй пик, который элюируется в

приблизительно 7,3 минуты, представляет собой пик тримеров. Определили, что белок оболочки ConC\_SOSIP является тримерным на приблизительно 27%. Образование агрегатов и мономеров указывает на то, что некоторая степень неправильного сворачивания и нестабильности ассоциированы с белком Env gp140 HIV, имеющим консенсусную последовательность ConC\_SOSIP. Как продемонстрировано с помощью хроматограмм, показанных на ФИГ. 3, все одиночные замены приводили к относительно высокому пику тримеров по сравнению с пиком тримеров в случае белка оболочки ConC\_SOSIP, что указывает на то, что выход тримеров повышался у каждого из вариантов gp140 HIV.

В своей совокупности результаты демонстрируют, что аминокислотные замены, идентифицированные в (i) - (vii) из таблицы 1 в данном документе, обеспечивают рекомбинантные белки Env HIV с увеличенной процентной долей образования тримеров и/или увеличенным выходом тримеров. В частности, варианты белка Env HIV, имеющие несколько замен в идентифицированных положениях (i) - (vii) из таблицы 1, такие как варианты с комбинациями из двух или более из идентифицированных мутаций, как правило, проявляли даже более увеличенный выход тримеров и/или процентную долю образования тримеров по сравнению с вариантами белка Env HIV, имеющими только одиночную мутацию, что показывает возможный синергетический эффект комбинаций мутаций (i) - (vii) из таблицы 1. Белки оболочки HIV, характеризующиеся увеличенной процентной долей образования тримеров, являются преимущественными с точки зрения изготовления, например, вакцин, поскольку для них потребуется менее интенсивная очистка и удаление белка оболочки, присутствующего в препарате в нежелательных ненативных конформациях. Также увеличенный общий выход экспрессии тримера является преимущественным для изготовления вакцинного продукта.

**Пример 4. Варианты рекомбинантных белков оболочки HIV на основе консенсусной последовательности белка оболочки клады В**

Рекомбинантные белки Env HIV, содержащие одиночную аминокислотную замену (I535N, D589V, N651F или K655I), введенную в консенсусную последовательность клады В, ConB\_SOSIP (SEQ ID NO: 5) получали и очищали, как описано в примере 2. Выход тримеров и процентную долю образования тримеров измеряли с помощью анализа AlphaLISA, как описано в примере 3.

Результаты показаны на ФИГ. 4А (процентная доля образования тримеров) и ФИГ. 4В (выход тримеров). Значения представлены относительно значения, измеренного для белка оболочки ConB\_SOSIP, которое считали равным 1 как в случае процентной доли образования тримеров, так и в случае выхода тримеров. Результаты показывают, что все протестированные мутации увеличивали процентную долю образования тримеров. Выход тримеров был почти таким же или улучшенным по сравнению с белком оболочки ConB\_SOSIP для всех протестированных мутаций.

Эти результаты демонстрируют, что данные мутации также оказывали стабилизирующий эффект на белок оболочки, например, приводили к увеличенному



выходу тримеров, увеличенной процентной долей образования тримеров и т. д., если их вводили в другую каркасную последовательность белка оболочки HIV, в данном случае в консенсусную последовательность, полученную на основании белков клады В.

Пример 5. Варианты рекомбинантных белков оболочки HIV на основе синтетической последовательности белка оболочки

Рекомбинантные белки Env HIV, содержащие аминокислотные замены, введенные в синтетический белок оболочки HIV (называемый 'DS\_sC4\_SOSIP\_E166R'), имеющий последовательность, показанную под SEQ ID NO: 7, получали и очищали, как описано в примере 2. Синтетический белок оболочки HIV, DS\_sC4\_SOSIP\_E166R, имеет так называемые мутации SOSIP (Cys в остатках 501 и 605 и Pro в остатке 559), Cys в остатках 201 и 433, что приводит к введению дисульфидной (DS) связи, и Arg в положении 166 для стабилизации вершины. В дополнение, белок усечен по положению 655. Процентную долю образования тримеров и выход тримеров измеряли с помощью анализа AlphaLISA, описанного в примере 3.

Результаты показаны на ФИГ. 5, на которой процентная доля образования тримеров для каждого из протестированных вариантов сравнивается с процентной долей образования тримеров (фиг. 5A) и выходом тримеров (фиг. 5B) для каркасной последовательности DS\_sC4\_SOSIP\_E166R. В случае каждого из протестированных вариантов наблюдали большую процентную долю образования тримеров по сравнению с каркасной последовательностью.

Помимо E166R, некоторые другие редко встречающиеся аминокислоты меняли на более распространенные в соответствующем положении в совокупности белков Env HIV дикого типа (A114Q, E117K, T375S и I434M), чтобы 'восстановить' белок согласно остову, более подробно описанному в примере 12 ниже и на фиг. 13. В таком 'восстановленном' белке стабилизирующие мутации A204I и K655I обеспечивали еще большее улучшение sC4\_SOSIP (фиг. 14).

Результаты данного примера согласуются с результатами из примера 4, демонстрируя то, что мутации, описанные в данном документе, также оказывают стабилизирующий эффект на белок оболочки, например, приводят к увеличенной процентной доле образования тримеров и/или увеличенному выходу тримеров, если их вводили в другие каркасные последовательности белков оболочки HIV, в данном случае в неконсенсусную синтетическую последовательность Env.

Пример 6. Дополнительные комбинации мутаций Env HIV

Рекомбинантные белки Env HIV, содержащие аминокислотные замены, введенные в ConC\_SOSIP (имеющий последовательность, показанную под SEQ ID NO: 3), получали и очищали, как описано в примере 2. Процентную долю образования тримеров измеряли с помощью анализа AlphaLISA, как описано в примере 3. Впоследствии маленькую выборку комбинаций (комбинации, представленные ниже курсивом, и дополнительно K655I; I535N, D589V; I535N, K655I; D589V, K655I) очищали с применением лектина из *Galanthus nivalis* и анализировали содержание тримеров с применением SEC-MALS, как описано в

примере 3.

Для данного эксперимента получали следующие мутанты:

K655I, N651F;

K655I, N651F, E647F;

K655I, N651F, E647F, I535N;

K655I, N651F, I535N;

K655I, I573F;

K655I, D589V, I573F;

K655I, D589V, I573F, N651F;

K655I, D589V, I573F, K588E;

K655I, D589V, I573F, N651F, K588E;

K655I, D589V, I573F, N651F, K588E, I535N;

K655I, D589V, I573F, N651F, K588E, I535N, A204I;

K655I, D589V, I535N, L556P;

K655I, D589V, I573F, N651F, K588E, L556P;

K655I, D589V, A204I;

L556P, N651F;

L556P, N651F, K655I;

L556P, N651F, K655I, I535N;

L556P, N651F, K655I, I535N, I573F;

L556P, N651F, K655I, I535N, I573F, D589V;

L556P, N651F, K655I, I535N, I573F, D589V, A204I;

L556P, N651F, K655I, I535N, I573F, D589V, A204I, K588Q;

L556P, N651F, K655I, I535N, I573F, D589V, A204I, K588Q, E647F;

L556P, N651F, I535N;

L556P, N651F, I535N, I573F;

L556P, N651F, I535N, I573F, D589V;

L556P, N651F, I535N, I573F, D589V, A204I;

L556P, N651F, I535N, I573F, D589V, A204I, K588Q;

L556P, N651F, I535N, I573F, D589V, A204I, K588Q, E647F;

L556P, K655I, I535N;

L556P, K655I, I535N, I573F;

L556P, K655I, I535N, I573F, D589V;

L556P, K655I, I535N, I573F, D589V, A204I;

L556P, K655I, I535N, I573F, D589V, A204I, K588Q;

L556P, K655I, I535N, I573F, D589V, A204I, K588Q, E647F;

L556P, N651F, I535N, I573F, D589V, A204I, K588Q с удаленной мутацией SOS.

Все протестированные комбинации замен в каркасной последовательности ConC\_SOSIP продемонстрировали более высокую процентную долю тримеров и более высокий выход тримеров по сравнению с каркасной последовательностью в анализе

AlphaLISA (данные не показаны). С помощью SEC\_MALS подтвердили увеличенную процентную долю тримеров для всех протестированных мутаций в каркасной последовательности (данные не показаны).

Для набора белков, содержащих по порядку дополнительную мутацию вплоть до девяти мутаций, с помощью SEC-MALS продемонстрировано, что при введении каждой последующей мутации повышалось соотношение тример/мономер, при этом высота пика мономеров на графике SEC снижалась, при этом высота пика тримеров оставалась такой же (ФИГ. 6). Из всех вариантов, протестированных с помощью SEC-MALS, вариант с заменами L556P, N651F, K655I, I535N, I573F, D589V, A204I, K588Q, E647F продемонстрировал наибольшую процентную долю тримеров (наименьшее количество мономеров gp140 и наименьшее количество мономеров gp120), наибольший общий выход белка и один из наиболее высоких показателей температурной стабильности. Это означает, что данные мутации можно комбинировать без потери тримера по сравнению с каркасной последовательностью. В дополнение, это позволяет предполагать, в целом, что добавление мутаций, описанных в (i) - (vii) из таблицы 1, необязательно в комбинации с мутациями, описанными в таблице 2, приводит к дополнительно увеличенной тримеризации.

Также тестировали конструкцию с мутациями L556P, N651F, I535N, I573F, D589V, A204I, K588Q, в которой удалены 'мутации SOS' (т. е. два остатка цистеина в положениях 501 и 605 были обращены в аминокислотные остатки, которые изначально присутствовали в консенсусной последовательности клады C). Данный мутант характеризовался процентной долей и выходом тримеров, сравнимыми с таковыми у своего соответствующего мутанта, который не содержал мутацию SOS. Мутант, в котором была удалена мутация SOS, даже имел преимущество в том, что он связывался с меньшим количеством отличных от bNAb антител, чем соответствующий SOS-содержащий аналог (имеющий мутации L556P, N651F, I535N, I573F, D589V, A204I, K588Q). Это показывает то, что преимущественные свойства, такие как высокая процентная доля тримеризации, также можно получать в белках Env HIV, которые содержат не все мутации SOSIP.

Один мутант (протестированный на основе каркасной последовательности ConC\_SOSIP), исходя из комбинации благоприятных свойств в отношении уровня экспрессии, образования тримеров и связывания с нейтрализующим антителом широкого спектра действия PGT151, имеет следующие мутации: L556P, N651F, I535N, I573F, D589V, A204I, K588Q.

На основе ConC\_SOSIP 9 наиболее успешных замен представляли собой L556P, E647F, N651F, K655I, I535N, D589V, I573F и K588E в gp41 и A204I в gp120. Комбинация из всех данных 9 замен приводила к увеличенной стабильности, содержанию тримеров и выходу тримеров. Поскольку добавление L556P в данный вариант с 9 заменами оказывало относительно ограниченный эффект на увеличение процентной доли тримеров, а замена E647F в данном контексте, по видимому, препятствовала связыванию PGT151, эти две мутации не всегда применяли в дополнительных вариантах, и было обнаружено, что

вариант с 7 заменами (называемый ConC\_SOSIP\_7mut, также иногда обозначаемый в данном документе как 'стабилизированный ConC\_SOSIP' или 'ConC\_основа'; включающий N651F, K655I, I535N, D589V, I573F, K588E и A204I) был немного более стабильным (увеличенная температура плавления), чем вариант с 9 заменами, указанный выше. Полная последовательность данного варианта (стабилизированный белок Env ConC\_SOSIP, HIV 160544) представлена под SEQ ID NO: 20.

На данный момент особенно предпочтительный мутант [протестирован на основе каркасной последовательности ConC\_SOSIP со следующими дополнительными мутациями: (a) D279N, A281V, A362Q (увеличивают сходство с передаваемыми вирусами-основателями, как описано другими авторами); (b) Del139-152 (удаление вариативной петли для снижения шанса индукции антител к этой петле) и (c) V295N (введение гликанового сайта, который присутствует у большинства штаммов HIV)], исходя из комбинации благоприятных свойств в отношении уровня экспрессии, образования тримеров и связывания с нейтрализующим антителом широкого спектра действия, имеет следующие стабилизирующие мутации по настоящему изобретению: N651F, K655I, I535N, I573F, D589V, A204I, K588E. Полная последовательность данного варианта (стабилизированный белок Env с ConC\_SOSIP.v3 (HIV170654, ConC\_SOSIP.v3)) представлена под SEQ ID NO: 28.

В дополнительном варианте в эту конструкцию добавляли мутацию K658V (см. также пример 8 ниже), которая дополнительно улучшала результаты.

**Пример 7. Самособирающиеся частицы, представляющие стабилизированный белок Env HIV**

Получали самособирающиеся частицы на основе ферритина и DPS, которые представляли стабилизированные белки Env аналогично тому, как описано в (He et al, 2016). Чтобы добиться этого, белок gp140 сливали с N-концом частиц посредством короткого аминокислотного линкера (например, GSG или AAAGS, но также можно применять другие линкеры, см., например, He et al, 2016) на уровне ДНК и экспрессировали слитый белок в клетках Expi293F. Один пример частицы, который получали таким образом, был основан на ферритине, слитом с белком Env HIV с ConC\_SOSIP (SEQ ID NO: 3) со следующими мутациями: I535N, A558P, D589V, K655I. Также получали частицы на основе ферритина с данным белком Env, имеющим дополнительную мутацию V570D, которая, как сообщалось, увеличивает тримеризацию (Kesavardhana et al, 2014), но также наблюдали, что эта мутация приводит к сильному повышению связывания ненейтрализующим антителом (17b), что является нежелательным. Env с данными пятью мутациями также сливали с двумя типами частиц на основе DPS из *Helicobacter pylori* и из *Mycobacterium smegmatis* (см., например, WO2011/082087 относительно получения частиц на основе DPS). Env с данными пятью мутациями и, в дополнение, с двойной мутацией I201C-A433C, обеспечивающей введение дисульфидного мостика, также сливали с ферритином.

Частицы очищали от не содержащего клеток супернатанта с помощью афинных

гранул PGDM1400 и частицы анализировали с применением SEC-MALS с колонкой G6000PWCL TSKgel. С помощью SEC-MALS, а также Native PAGE (3-12%) подтверждали, что образовывались частицы примерно ожидаемых размеров.

Аналогичным образом также получали самособирающиеся наночастицы на основе ферритина и DPS, представляющие белок Env HIV, имеющий последовательность ConC\_SOSIP со следующими комбинациями мутаций: (L556P, N651F, I535N, I573F, D589V, A204I, K588Q).

Также получали дополнительные липосомы и/или самособирающиеся наночастицы, представляющие варианты Env HIV, описанные в данном документе, например, Env HIV, имеющие SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32.

Получали липосомы Ni-NTA и липосомы на основе ковалентной клик-химии с некоторыми из таких вариантов (Ingale J, et al. Cell Rep. 2016, 15(9):1986-99; Bak M, et al. Bioconjug Chem. 2016, 27(7):1673-80). Липосомы анализировали с применением ns-ТЕМ, который показал равномерно расположенный в пространстве, ортогонально отображенный и плотно покрытый белок Env HIV на поверхности липосом.

Пример 8. Белок Env HIV со стабилизирующей тример мутацией в положении 658

Рекомбинантные белки Env HIV с мутациями по типу замены в положении 658 (нумерация согласно gp160 из изолята HXB2 HIV-1) получали с применением каркасной последовательности ConC\_SOSIP (SEQ ID NO: 3). K658 подвергали мутации с заменой на Val, Ile, Phe, Met, Ala и Leu. В дополнение получали несколько двойных мутантов, в которых эти мутации объединяли с одной из описанных выше стабилизирующих мутаций, K655I. Процентную долю образования тримеров определяли с помощью анализа AlphaLISA, как описано в примере 3.

Результаты представлены на фиг. 7А и 7В (процентная доля тримеров, измеренная в разных экспериментах, отсюда две панели) и фиг. 7С и 7D (выход тримеров, измеренный в разных экспериментах, отсюда две панели). С помощью этих результатов продемонстрировано, что замена в положении 658 на Ile, Phe, Met, Leu, Ala или Val приводила к увеличенной процентной доле образования тримеров и увеличенному выходу тримеров. Замена на Ile в положении 658 приводила к повышению, которое находилось приблизительно в том же диапазоне, что и повышение в случае мутации K655I (фиг. 7А, С), которая представляла собой одиночную мутацию, приводящую к наилучшим показателям, среди мутаций в таблице 1, описанных выше (см., например, фиг. 2А). Замена на Val в положении 658 приводила к еще большему улучшению (фиг. 7А, С).

Результаты также показывают, что замену в положении 658 на Ile или Val можно комбинировать с мутацией K655I, которая была описана выше, и что это приводило к дополнительному улучшению по сравнению с каждой из соответствующих одиночных мутаций (фиг. 7А, С).

Мутацию K658V также тестировали с применением SEC-MALS. Культуры выращивали в 96-луночных планшетах в течение трех дней, как и в случае AlphaLISA. Супернатант напрямую загружали в колонку SEC-MALS. Хроматограммы, полученные

для ложного супернатанта (с экспрессией фурина), вычитали из хроматограмм супернатанта с белками Env. Тримерный белок элюировался из колонки в интервале 7-8 минут. Результаты представлены на фиг. 8, и они подтверждают, что белок с мутацией K658V продемонстрировал улучшенную тримеризацию по сравнению с фоновым белком Env и по сравнению с белком Env с мутацией K655I.

В этом примере продемонстрировано, что замена аминокислоты в положении 658 белка Env HIV на Val, Ile, Phe, Met, Leu или Ala приводит к увеличенной процентной доле тримеров и выходу тримеров.

Дополнительные эксперименты по измерению образования тримеров вариантами с применением AlphaLISA и/или SEC-MALS проводят для вариантов Env HIV, у которых мутация K658V присутствует в комбинации с другими мутациями из таблицы 1 и/или 2, описываемыми в данном документе, а также для штаммов HIV из клады A и B. Например, уже было показано, что мутация 658V улучшает вариант ConC\_SOSIP,7mut, описанный выше (пример 7), а также BG505\_SOSIP с L556P, K655I, M535N, N651F, D589V, K588E (описано ниже в примере 9), а также восстановленный и стабилизированный C97ZA\_SOSIP (описано ниже в примере 10).

Исходя из описанных выше результатов, ожидается, что мутация по типу замены аминокислоты в положении 658 на валин, изолейцин, фенилаланин, лейцин, метионин или аланин, предпочтительно на остаток валина, будет увеличивать образование тримеров и/или выход тримеров у различных фоновых белков Env HIV.

**Пример 9.** Варианты рекомбинантных белков оболочки HIV на основе последовательности белка оболочки клады A

Одиночные аминокислотные замены (I535N, D589V, N651F, K655I, I573F, A204I или E647F) вводили в белок оболочки HIV клады A дикого типа с модификацией SOSIP (называемый 'BG505\_SOSIP'), описываемый в примере 2. Белок оболочки HIV, BG505\_SOSIP, имеет так называемые мутации SOSIP (Cys в остатках 501 и 605 и Pro в остатке 559), а также дополнительно Cys в остатках 201 и 433, что приводит к введению дисульфидной (DS) связи, и потенциальный сайт N-гликозилирования в положении 332 (мутация T332N). Белок усечен по положению 664. Последовательность BG505\_SOSIP показана под SEQ ID NO: 21.

Процентную долю образования тримеров и выход тримеров измеряли с помощью анализа AlphaLISA, описанного в примере 3. Процентную долю образования тримеров и выход тримеров для каждого из протестированных вариантов сравнивали с BG505\_SOSIP. Более высокую процентную долю образования тримеров наблюдали в случае замен M535N, D589V, N651F или K655I по сравнению каркасной последовательностью (например, фиг. 9A). Комбинация, например, L556P, K655I и M535N, продемонстрировала даже более увеличенный выход и процентную долю тримеров (например, фиг. 9A и 9B). Комбинация N651F и D589V еще больше увеличивала выход и процентную долю тримеров (данные не показаны). Результаты из этого примера в отношении вируса клады A согласуются с таковыми из примеров 10 и 11 (клада C) ниже и примера 5 (клада B), в

которых мутации I535N, D589V, N651F и K655I также оказывали стабилизирующий эффект на белок оболочки, полученный из штаммов дикого типа, например, приводили к увеличенной процентной доле образования тримеров и/или увеличенному выходу тримеров. Очевидно, данные мутации также улучшают тримеризацию Env HIV, полученного из штамма кланды А дикого типа.

На данный момент особенно предпочтительным мутантом (протестирован на основе каркасной последовательности BG505\_SOSIP), исходя из комбинации благоприятных свойств в отношении уровня экспрессии, образования тримеров и связывания с нейтрализующим антителом широкого спектра действия, является мутант, имеющий следующие мутации: L556P, K655I, M535N, N651F, D589V (см., например, фиг. 10, на которой показано сильно увеличенное образование тримеров такого мутанта при анализе SEC-MALS, и фиг. 14, на которой показано явно улучшенное связывание такого мутанта нейтрализующими антителами широкого спектра действия). Последовательность данного стабилизированного белка Env BG505\_SOSIP (HIV170863) показана под SEQ ID NO: 22.

Добавление мутации Q658V обеспечило небольшое дополнительное улучшение.

Дополнительная предпочтительная конструкция содержит мутации L556P, K655I, M535N, N651F, D589V, а также мутации 'DS' (Cys в положениях 201 и 433, что приводит к введению дисульфидной связи), R588E и Q658V. Последовательность такого варианта (белок Env с BG505\_SOSIP.v2, HIV171814) представлена под SEQ ID NO: 29.

Дифференциальную сканирующую калориметрию применяли для определения температур плавления, которые являются показателем стабильности тримеров Env HIV. Температуры плавления для Env HIV определяли с применением капиллярной системы DSC MicroCal. На измерение использовали 400 мкл 0,5 мг/мл образца белка. Измерение проводили при начальной температуре 20°C и конечной температуре 110°C. Скорость сканирования 100°C/ч. и режим с обратной связью; низкий (=усиление сигнала). Данные анализировали с применением Origin J. Software (инструмент для VP-анализа от MicroCal).

Температуру плавления варианта Env BG505\_SOSIP.v2 Env (HIV171814) (SEQ ID NO: 29) измеряли с помощью DSC, и она составляла 82,2°C, при этом каркасная последовательность BG505\_SOSIP (SEQ ID NO: 21) характеризуется температурой плавления 67,8°C.

Пример 10. Варианты рекомбинантных белков оболочки HIV на основе последовательности белка оболочки дикого типа кланды С

Рекомбинантные белки Env HIV согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, содержащие одиночную аминокислотную замену T651F, двойную аминокислотную замену T651F, M535N, введенные в последовательность Env WT, C97ZA\_SOSIP (SEQ ID NO: 23) с дополнительной заменой L556P (C97ZA\_SOSIP\_L556P), получали и экспрессировали, как описано в примере 2. Выход тримеров и процентную долю образования тримеров измеряли с помощью анализа AlphaLISA, как описано в примере 3.

Результаты показаны на ФИГ. 11А и В. Выход тримеров C97ZA\_SOSIP\_L556P\_T651F\_M535N в пять раз превышает таковой в случае каркасной последовательности C97ZA\_SOSIP.

Таким образом, замены L556P, T651F и M535N обеспечили большое улучшение C97ZA\_SOSIP, но связывание с bNAbs и процентная доля тримеров для данного варианта, полученного из последовательности дикого типа клады C, все еще были намного ниже, чем для каркасной последовательности ConC\_SOSIP. Поскольку Env wt может быть адаптирован к своему хозяину, что возможно снижает его общую приспособленность, и вследствие этого может быть нарушено сворачивание, последовательность Env 'восстанавливали' согласно концептуальному остову, описанному ниже в примере 12 и на ФИГ. 13. Для восстановления последовательности в целом изменяли 21 остаток и добавляли три потенциальных сайта N-гликозилирования (PNGS) для заполнения так называемых "гликановых дыр" (положения, в которых у по меньшей мере 50% белков Env HIV штаммов дикого типа присутствует потенциальный сайт N-гликозилирования). Мутации, введенные в C97ZA\_SOSIP в соответствии с данным остовом, указаны в таблице 3 в колонке 'Восстанавливающие мутации'. Добавление стабилизирующей мутации K655I, раскрытой в данном документе, повышало процентную долю тримеров и выход еще больше, чем D589V, A204I и K588E.

Данные результаты демонстрируют, что мутации T651F, M535N и K655I, D589V, A204I и K588E, описанные в данном документе, также оказывали стабилизирующий эффект на белок оболочки, например, приводили к увеличенному выходу тримеров, увеличенной процентной доле образования тримеров при введении в C97ZA\_SOSIP (полученную из белка Env штамма дикого типа клады C) и ее варианты.

На данный момент особенно предпочтительным вариантом (протестирован на основе каркасной последовательности C97ZA\_SOSIP), исходя из комбинации благоприятных свойств в отношении уровня экспрессии, образования тримеров и связывания с нейтрализующим антителом широкого спектра действия, является вариант, имеющий следующие мутации: Q567K (описана другими авторами ранее); A198T, S243N, K236T, V295N (для заполнения гликановых дыр); M34L, T46K, T58A, Q171K, G172V, P179L, L183Q, I192R, N209T, M307I, Q350R, N352H, Y353F, D412N, G429E, V455T, I489V, L491I, G500K, S547G, T578A, T651N (для восстановления последовательности); V505N, E507T, T663N (с добавлением потенциальных сайтов N-гликозилирования в основание молекулы) и A204I, M535N, L556P, K588E, D589V, T651F, K655I (стабилизирующие мутации по настоящему изобретению). Данные для этого варианта показаны, например, на фиг. 14, (см., в частности, 'стабилизированный и восстановленный C97ZA' на ней), на которой показано очень большое повышение связывания с нейтрализующими антителами широкого спектра действия по сравнению с исходной молекулой Env C97ZA wt. Последовательность данного варианта (стабилизированный и восстановленный белок Env C97ZA\_SOSIP (HIV170690)) представлена под SEQ ID NO: 24.



Добавление мутации K658V еще дополнительно стабилизировало данный белок.

Дополнительный предпочтительный вариант содержит мутацию 'DS' и K658V, и последовательность этого варианта (восстановленный и стабилизированный белок Env C97ZA\_SOSIP.v2, HIV171810) представлена под SEQ ID NO: 30. Температура плавления, определенная с помощью DSC, составляет 80,2°C.

Пример 11. Варианты рекомбинантных белков оболочки HIV на основе другой последовательности белка оболочки дикого типа кланды C

В белок Env из штамма Du422 кланды C вводили мутации SOSIP и осуществляли заполнение двух гликановых дыр в положениях 295 и 386 с помощью мутаций K295N и D386N. В дополнение восстанавливали некоторые остатки согласно концептуальному остову, описанному в примере 12 и на фиг. 13 (V272I, W456R, G466E и F643Y), и вводили стабилизирующие замены L556P, I535N, N651F и D589V. Все дополнительные замены приводили к более высоким показателям выхода тримеров и процентным долям тримеров (например, фиг. 12).

В конкретном протестированном варианте с данными четырьмя стабилизирующими мутациями (SEQ ID NO: 25) дополнительная замена K655I дополнительно повышала выход тримеров и процентную долю тримеров в 1,3 и 1,4 раза соответственно (данные не показаны).

На данный момент особенно предпочтительным вариантом Env Du422\_SOSIP, исходя из комбинации благоприятных свойств в отношении уровня экспрессии, образования тримеров и связывания с нейтрализующим антителом широкого спектра действия, является вариант, имеющий следующие мутации: L556P, K655I, M535N, N651F, D589V, K588E, I201C, A433C, V272I, W456R, G466E, F643Y, D386N и K295N. Последовательность данного варианта (стабилизированный и восстановленный белок Env Du422\_SOSIP (HIV170859) представлена под SEQ ID NO: 26. Данные для этого варианта показаны, например, на фиг. 14 (см. стабилизированный и восстановленный Du422 на ней), на которой показано очень большое повышение связывания с нейтрализующими антителами широкого спектра действия по сравнению с исходной молекулой Env Du422 wt.

Дополнительный предпочтительный вариант дополнительно содержит мутацию 'DS' и K658V, и последовательность этого варианта (восстановленный и стабилизированный белок Env Du422\_SOSIP.v1, HIV171812) представлена под SEQ ID NO: 31. Температура плавления, определенная с помощью DSC, составляет 78,9°C.

Пример 12. Восстановление и стабилизация различных последовательностей Env HIV-1

Поскольку последовательности wt из вирусов, выделенных у инфицированных пациентов, могут иметь приобретенные дестабилизирующие мутации, которые затрудняют правильное сворачивание, последовательности Env wt из кланды C, C97ZA, DU422, и мозаичную последовательность sC4 вначале подвергали восстановлению.

Для поиска неоптимальных мутаций в последовательностях дикого типа проводили

выравнивание всех последовательностей Env HIV-1 в базе данных UniProt и базе данных HIV Los Alamos (~90000 последовательностей) и для каждой аминокислоты рассчитывали распределение аминокислот. В целом, ряд относительно редко встречающихся аминокислот в последовательностях Env wt заменяли на более распространенные аминокислоты (на основе частоты в соответствующем положении в базе данных) согласно концептуальному остову, описанному на ФИГ. 13.

Кроме того, две дополнительные замены Y353F и Q171K вводили на вершине C97ZA\_SOSIP для возможного улучшения связывания с антителами, нацеливающимися на вершину, и за счет замены D411N, K236T и V295N вводили дополнительные гликановые сайты, поскольку данные потенциальные сайты N-гликозилирования (PNGS) были консервативными на >50%. Следующим шагом, в восстановленную последовательность переносили стабилизирующие замены, описанные в предыдущих примерах.

Стабилизированный ConC\_SOSIP содержит замены A204I, I535N, I573F, K588E, D589V, N651F и K655I (стабилизированный ConC\_SOSIP). Полная последовательность стабилизированного ConC\_SOSIP представлена под SEQ ID NO: 20.

Обзор некоторых из вариантов белков Env и их мутаций представлен в таблице 3.

Таблица 3. Варианты белка Env HIV

| Белок                           | Мутации, описанные в литературе | Добавленные PNGS | Лидерная последовательность (SEQ ID NO:) | Восстанавливающие мутации | Стабилизирующие мутации                         | Другие мутации                     | Конеч |
|---------------------------------|---------------------------------|------------------|------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------|-------|
| ConC_SOSIP                      | A501C, T605C, I559P             | V295N            | 11                                       |                           |                                                 |                                    | 664   |
| Стабилизированный ConC_SOSIP    | A501C, T605C, I559P             | V295N            | 11                                       |                           | A204I, I535N, I573F, K588E, D589V, N651F, K655I |                                    | 664   |
| Стабилизированный ConC_SOSIP.v3 | A501C, T605C, I559P             | V295N            | 11                                       |                           | A204I, I535N, I573F, K588E, D589V, N651F, K655I | Дельта138-152, D297N, A281V, A362Q | 664   |
| BG505_SOSIP                     | A501C, T605C, I559P             | T332N            | 34                                       |                           |                                                 |                                    | 664   |

|                                          |                                   |                            |    |                                                                                                                                                 |                                                 |                     |     |
|------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------|-----|
| <b>Стабилизированный BG505_SO SIP</b>    | A501C, T605C, I559P               | T332N                      | 34 |                                                                                                                                                 | M535N, L556P, D589V, N651F, K655I               |                     | 664 |
| <b>Стабилизированный BG505_SO SIP.v2</b> | A501C, T605C, I559P, I201C, A433C | T322N                      | 34 |                                                                                                                                                 | M535N, L556P, D589V, N651F, K655I, R588E, Q658V |                     | 664 |
| <b>C97ZA_SO SIP</b>                      | A501C, T605C, I559P, L535M, Q567K |                            | 43 |                                                                                                                                                 |                                                 |                     | 664 |
| <b>Восстановленный C97ZA_SO SIP</b>      | A501C, T605C, I559P, L535M, Q567K | A198T, S243N, K236T, V295N | 11 | M34L, T46K, T58A, Q171K, G172V, P179L, L183Q, I192R, N209T, M307I, Q350R, N352H, Y353F, D412N, G429E, V455T, I489V, L491I, G500K, S547G, T578A, |                                                 | V505N, E507T, T663N | 664 |

|                                                                                  |                                                         |                                     |    |                                                                                                                                                                                                      |                                                                          |                           |     |
|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-----|
|                                                                                  |                                                         |                                     |    | T651N                                                                                                                                                                                                |                                                                          |                           |     |
| <b>Восстанов<br/>ленный и<br/>стабилизир<br/>ованный<br/>C97ZA_SO<br/>SIP</b>    | A501C,<br>T605C,<br>I559P,<br>Q567K                     | A198T,<br>S243N,<br>K236T,<br>V295N | 11 | M34L, T46K,<br>T58A,<br>Q171K,<br>G172V,<br>P179L,<br>L183Q,<br>I192R,<br>N209T,<br>M307I,<br>Q350R,<br>N352H,<br>Y353F,<br>D412N,<br>G429E,<br>V455T,<br>I489V, L491I,<br>G500K,<br>S547G,<br>T578A | A204I,<br>M535N,<br>L556P,<br>K588E,<br>D589V,<br>T651F, K655I           | V505N,<br>E507T,<br>T663N | 664 |
| <b>Восстанов<br/>ленный и<br/>стабилизир<br/>ованный<br/>C97ZA_SO<br/>SIP.v2</b> | A501C,<br>T605C,<br>I559P,<br>Q567K,<br>I201C,<br>A433C | A198T,<br>S243N,<br>K236T,<br>V295N | 11 | M34L, T46K,<br>T58A,<br>Q171K,<br>G172V,<br>P179L,<br>L183Q,<br>I192R,<br>N209T,<br>M307I,<br>Q350R,<br>N352H,<br>Y353F,<br>D412N,<br>G429E,                                                         | A204I,<br>M535N,<br>L556P,<br>K588E,<br>D589V,<br>T651F, K655I,<br>K658V | V505N,<br>E507T,<br>T663N | 664 |

|                                                                                  |                                            |                 |    |                                                      |                                                                |                   |     |
|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------|----|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------|-----|
|                                                                                  |                                            |                 |    | V455T,<br>I489V, L491L,<br>G500K,<br>S547G,<br>T578A |                                                                |                   |     |
| <b>Du422_SOS<br/>IP</b>                                                          | A501C,<br>T605C, I559P                     | D386N,<br>K295N | 11 |                                                      |                                                                |                   | 664 |
| <b>Восстанов<br/>ленный<br/>Du422_SOS<br/>IP</b>                                 | A501C,<br>T605C, I559P                     | D386N,<br>K295N | 11 | V272I,<br>W456R,<br>G466E,<br>F643Y                  |                                                                |                   | 664 |
| <b>Восстанов<br/>ленный и<br/>стабилизир<br/>ованный<br/>Du422_SOS<br/>IP</b>    | A501C,<br>T605C, I559P                     | D386N,<br>K295N | 11 | V272I,<br>W456R,<br>G466E,<br>F643Y                  | M535N,<br>L556P,<br>K588E,<br>D589V,<br>N651F, K655I           |                   | 664 |
| <b>Восстанов<br/>ленный и<br/>стабилизир<br/>ованный<br/>Du422_SOS<br/>IP.v1</b> | A501C,<br>T605C,<br>I559P, I201C,<br>A433C | D386N,<br>K295N | 11 | V272I,<br>W456R,<br>G466E,<br>F643Y                  | M535N,<br>L556P,<br>K588E,<br>D589V,<br>N651F,<br>K655I, K658V | -                 | 664 |
| <b>DS_sC4_S<br/>OSIP</b>                                                         | A501C,<br>T605C,<br>I559P, I201C,<br>A433C | V295N           | 33 |                                                      |                                                                |                   | 655 |
| <b>Восстанов<br/>ленный<br/>DS_sC4_S<br/>OSIP</b>                                | A501C,<br>T605C,<br>I559P, I201C,<br>A433C | V295N           | 33 | A114Q,<br>E117K,<br>E166R,<br>T375S,<br>I434M        |                                                                |                   | 655 |
| <b>Восстанов<br/>ленный и</b>                                                    | A501C,<br>T605C,                           | V295N           | 33 | A114Q,<br>E117K,                                     | A204I, I535N,<br>L556P,                                        | дельта13<br>8-152 | 655 |

|                                                                       |                                            |       |    |                                                                            |                                                   |                                                                                                                |     |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------|----|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| стабилизир<br>ованный<br>DS_sC4_S<br>OSIP                             | I559P, I201C,<br>A433C                     |       |    | E166R,<br>T375S,<br>I434M                                                  | Q588E,<br>D589V,<br>N651F, K655I                  | (SSNGT<br>YNIHN<br>ETYK),<br>дельта19<br>1<br>(SEKSSE<br>NSSE),<br>дельта<br>463<br>(GVP)                      |     |
| Восстанов<br>ленный и<br>стабилизир<br>ованный<br>DS_sC4_S<br>OSIP.v4 | A501C,<br>T605C,<br>I559P, I201C,<br>A433C | V295N | 33 | A114Q,<br>E117K,<br>E166R,<br>T375S,<br>I434M                              | A204I, I535N,<br>L556P,<br>Q588E,<br>N651F, K655I | Дельта13<br>8-152<br>(SSNGT<br>YNIHN<br>ETYK),<br>дельта19<br>1<br>(SEKSSE<br>NSSE),<br>дельта<br>463<br>(GVP) | 655 |
| Восстанов<br>ленный<br>ADM30337.<br>1                                 | A501C,<br>T605C, I559P                     | -     | 42 | S72H,<br>D234N,<br>R651N,<br>F602L,<br>Y621D,<br>V413T,<br>V316T,<br>V544L | -                                                 | -                                                                                                              | 664 |
| Восстанов<br>ленный и<br>стабилизир<br>ованный                        | A501C,<br>T605C, I559P                     |       | 42 | S72H,<br>D234N,<br>R651N,<br>F602L,                                        | I535N, L556P,<br>K588E,<br>D589V,<br>N651F,       | -                                                                                                              | 664 |

|                                                   |                        |   |    |                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                |   |     |
|---------------------------------------------------|------------------------|---|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|---|-----|
| <b>ADM30337.1</b>                                 |                        |   |    | Y621D,<br>V413T,<br>V316T,<br>V544L                                                                                                                                                                                                       | K655I, K658V                                                   |   |     |
| <b>Восстановленный ZM233M</b>                     | A501C,<br>T605C, I559P | - | 39 | S67N, I156N,<br>V174A,<br>V414I,<br>M33N,<br>T347K,<br>H638Y,<br>A394T,<br>F274S,<br>T471G,<br>S316T,<br>V323I,<br>L410S,<br>Y134V,<br>A335E,<br>I395Y, A65V,<br>D130N,<br>A612S,<br>I111L,<br>S195N,<br>N477D,<br>K152E,<br>L181I, S463N | -                                                              | - | 664 |
| <b>Восстановленный и стабилизированный ZM233M</b> | A501C,<br>T605C, I559P | - | 39 | S67N, I156N,<br>V174A,<br>V414I,<br>M33N,<br>T347K,<br>H638Y,<br>A394T,<br>F274S,<br>T471G,                                                                                                                                               | M535N,<br>L556P,<br>K588E,<br>D589V,<br>N651F,<br>K655I, K658V | - | 664 |

|                                                                      |                        |   |    |                                                                                                                                                                 |                                                             |   |     |
|----------------------------------------------------------------------|------------------------|---|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---|-----|
|                                                                      |                        |   |    | S316T,<br>V323I,<br>L410S,<br>Y134V,<br>A335E,<br>I395Y, A65V,<br>D130N,<br>A612S,<br>I111L,<br>S195N,<br>N477D,<br>K152E,<br>L181I, S463N                      |                                                             |   |     |
| <b>Восстанов<br/>ленный<br/>CN97001</b>                              | A501C,<br>T605C, I559P | - | 40 | Y187bN,<br>A77T, I232T,<br>V33N,<br>Q354P,<br>E99D,<br>P462N,<br>T185N,<br>T49K,<br>Q105H,<br>N102D,<br>V525A,<br>R132T,<br>E130N,<br>V164E,<br>N477D,<br>T219A | -                                                           | - | 664 |
| <b>Восстанов<br/>ленный и<br/>стабилизир<br/>ованный<br/>CN97001</b> | A501C,<br>T605C, I559P | - | 40 | Y187bN,<br>A77T, I232T,<br>V33N,<br>Q354P,<br>E99D,<br>P462N,                                                                                                   | I535N, L556P,<br>K588E,<br>D589V,<br>N651F,<br>K655I, K658V | - | 664 |



|                                                                     |                        |   |    |                                                                                                                                                  |                                                             |   |     |
|---------------------------------------------------------------------|------------------------|---|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---|-----|
|                                                                     |                        |   |    | T185N,<br>T49K,<br>Q105H,<br>N102D,<br>V525A,<br>R132T,<br>E130N,<br>V164E,<br>N477D,<br>T219A                                                   |                                                             |   |     |
| <b>Восстанов<br/>ленный<br/>ZM246F</b>                              | A501C,<br>T605C, I559P | - | 41 | S113D,<br>R339N,<br>P63K,<br>K415T,<br>K172E,<br>T153E,<br>S335E,<br>S160N,<br>I303T,<br>K448N,<br>I444T,<br>G347K,<br>Q106E,<br>G293E,<br>I135N | -                                                           | - | 664 |
| <b>Восстанов<br/>ленный и<br/>стабилизир<br/>ованный<br/>ZM246F</b> | A501C,<br>T605C, I559P | - | 41 | S113D,<br>R339N,<br>P63K,<br>K415T,<br>K172E,<br>T153E,<br>S335E,<br>S160N,<br>I303T,<br>K448N,                                                  | I535N, L556P,<br>K588E,<br>D589V,<br>N651F,<br>K655I, K658V | - | 664 |

|  |  |  |  |                                               |  |  |  |
|--|--|--|--|-----------------------------------------------|--|--|--|
|  |  |  |  | I444T,<br>G347K,<br>Q106E,<br>G293E,<br>I135N |  |  |  |
|--|--|--|--|-----------------------------------------------|--|--|--|

Таблица 3. Несколько вариантов белков Env HIV, описанных в данном документе. В колонке 'Мутации, описанные в литературе', описаны мутации, которые применяли в этих конструкциях и которые были ранее описаны другими авторами. В колонке 'Добавленные PNGS' описаны мутации, при которых добавляется потенциальный сайт N-гликозилирования (в положениях, в которых многие белки Env дикого типа содержат такой сайт). В колонке 'Лидерная последовательность' описано, какую лидерную последовательность применяли для экспрессии, если это не была исходная (нативная) лидерная последовательность. В колонке 'Восстанавливающие мутации' описаны мутации, которые улучшают сворачивание и стабильность (измеряемые как выход и процентная доля тримеров на основании связывания с bNAb) некоторых белков Env дикого типа, как описано в примере 12 и на фиг. 13. В колонке 'Стабилизирующие мутации' описаны мутации из таблицы 1 и 2, которые стабилизируют белок и улучшают тримеризацию, как раскрыто в данном документе. В колонке 'Дополнительные мутации' описаны дополнительные мутации, осуществленные в отношении некоторых конструкций. В колонке 'Конец' описано положение последней аминокислоты (нумерация на протяжении всей таблицы соответствует последовательности Env HXB2).

Супернатанты клеток, транзигентно трансфицированных с помощью вариантов Env дикого типа (wt), восстановленных и стабилизированных вариантов, тестировали в отношении связывания с несколькими тримерспецифическими нейтрализующими антителами широкого спектра действия, нацеливающимися на вершину. Восстанавливающие замены и, особенно, стабилизирующие замены оказывали значительное влияние на содержание тримеров (фиг. 14 и 15), определенное с помощью AlphaLISA (фиг. 14) и SEC-MALS (фиг. 15).

Последовательность предпочтительного варианта восстановленного и стабилизированного белка Env DS\_sC4 (восстановленный и стабилизированный Env DS\_sC4\_SOSIP (HIV170686)) представлена под SEQ ID NO: 27.

Другой предпочтительный вариант белка представлен под SEQ ID NO: 32 (восстановленный и стабилизированный Env sC4\_SOSIP.v4). Температура плавления, определенная с помощью DSC, составляет 82,8°C.

### **Пример 13. Функционирование стабилизирующих мутаций по настоящему изобретению при отсутствии мутаций SOSIP**

Как показано в предыдущих примерах, 7 мутаций (A204I, I535N, I573F, K588E, D589V, N651F и K655I) увеличивали выход и процентную долю тримеров у ConC\_SOSIP

(что привело к 'ConC\_основа', или 'стабилизированному ConC\_SOSIP', или 'ConC\_SOSIP 7mut') (например, фиг. 14 и 16).

В этом примере продемонстрировано, что различные мутации SOSIP (т. е. мутация 'SOS': 2 замены на остатки Cys в положениях 501 и 605; и 'мутация IP': замена на остаток Pro в положении 559) вносят дополнительный вклад в стабилизацию, но не требуются для получения преимуществ от мутаций по настоящему изобретению.

Было показано, что 7 мутаций также увеличивают выход тримеров у называемого ConC\_SOS, который не содержит стабилизирующую мутацию I559P (мутация 'IP'), как показано на фиг. 16 (сравните ConC\_SOS относительно ConC\_SOS, 7mut). Следовательно, мутация 'IP' не является необходимой для получения преимущества от мутаций, описанных в данном документе. Добавление мутации I559P приводило к большому повышению, это показывает то, что в данной конструкции мутация 'IP' является преимущественной в дополнение к 7 мутациям по настоящему изобретению. Стабилизирующую мутацию IP (I559P) также можно было заменить на A558P или L556P, обе из которых также приводят к большому повышению относительно варианта с отсутствием мутации I559P.

Также ConC\_IP, 7 mut, который содержит 7 описанных выше мутаций по настоящему изобретению, но в котором отсутствуют мутации 'SOS', все еще показывал очень высокий выход тримеров, что также свидетельствует о том, что мутации 'SOS' не являются необходимыми для получения преимущества от мутаций, описанных в данном документе (например, сравните ConC\_SOSIP относительно ConC\_IP, 7 mut), наряду с наблюдениями в примере 7. Добавление мутации 'SOS' не приводило к дополнительному повышению выхода тримеров.

Таким образом, хотя тримеры Env, содержащие стабилизирующие мутации, описанные в данном документе, могут получать дополнительное преимущество от стабилизации с помощью мутаций SOSIP, ни одна из 3 мутаций SOSIP не требуется для получения преимуществ (например, увеличенного выхода тримеров) за счет стабилизирующих мутаций, описанных в данном документе.

#### **Пример 14. Замена на метионин в положениях 647, 651 или 655 улучшает качество тримеров**

В дополнение к мутациям, описанным в примере 2, положения 589, 647, 651 и 655 по отдельности заменяли на остаток Met в каркасной последовательности ConC\_SOSIP (SEQ ID NO: 3) и тестировали в отношении процентной доли тримеризации и выхода тримеров с применением способов, описанных выше. Было показано, что Met в положениях 647, 651 или 655, подобно мутациям, описанным в примере 2, улучшал качество тримера (более высокие процентная доля и выход тримеров, повышенное связывание с bNAbs), как можно увидеть на фиг. 17.

Таким образом, помимо замены на Phe, Ala или Trp в положении 651, замена на Met в положении 651 также улучшает образование тримеров; помимо замены на Phe, Leu или Trp в положении 655, замена на Met в положении 655 также улучшает образование

тримеров; и, помимо замены на Phe или Ile в положении 647, замена на Met в положении 647 также улучшает образование тримеров.

#### **Пример 15. Иммунизация с помощью стабилизированных белков Env HIV**

Исследование по иммунизации кроликов проводили с использованием белков Env, связанных с липосомами, как описано в примере 7. Примирование проводят с помощью стабилизированного ConC\_SOSIP.v3 (SEQ ID NO: 28), отображенного на липосомах Ni-NTA, и продолжают четырьмя бустерными введениями с помощью липосом на основе ковалентной клик-химии, каждое с применением другого белка, т. е. с применением: 1) восстановленного и стабилизированного sC4\_SOSIP.v4 (SEQ ID NO: 32); 2) восстановленного и стабилизированного C97ZA\_SOSIP.v2 (SEQ ID NO: 30); 3) восстановленного и стабилизированного Du422\_SOSIP.v1 (SEQ ID NO: 31) и 4) стабилизированного BG505\_SOSIP.v2 (SEQ ID NO: 29).

После успешных иммунизаций выделяют сыворотку крови и анализируют ее в отношении индуцированных антител, которые, в частности, связываются со стабильной закрытой конформацией Env до слияния (с применением ELISA), а также в отношении индукции bNAbs (с применением анализов нейтрализации вируса).

В этот момент сыворотку крови выделяли после примирования и бустерных введений 1, 2 и 3 и анализировали в отношении индуцирования гетерологичных нейтрализующих Ab категории 2 с применением анализов вирусной нейтрализации. Данные представлены на фиг. 19. Нейтрализующую активность наблюдали в сыворотке крови 7/7 животных в отношении по меньшей мере 2 различных гетерологичных псевдовирусов из клады C категории 2, что указывает на ограниченное индуцирование гетерологичных NAb категории 2 у иммунизированных Env животных по сравнению с контрольными животными с имитацией инъекции. На данный момент только несколько исследовательских групп заявили о сравнимых уровнях гетерологичной нейтрализации категории 2 в моделях иммуногенности у кроликов.

#### **Пример 16. Восстановление и стабилизация нескольких белков Env wt из клады C, которые, как известно, образуют очень низкие уровни тримеров**

В белок Env, полученный из штамма ZM233M клады C, Env с худшим сворачиванием, известный из литературы (Julien et al, 2015, выше), вводили мутации SOSIP. Кроме того, восстанавливали ряд остатков согласно концептуальному остову, описанному в примере 12 и на фиг. 13 (S67N, I156N, V174A, V414I, M33N, T347K, H638Y, A394T, F274S, T471G, S316T, V323I, L410S, Y134V, A335E, I395Y, A65V, D130N, A612S, I111L, S195N, N477D, K152E, L181I, S463N), и вводили стабилизирующие замены M535N, L556P, K588E, D589V, N651F, K655I, K658V. Последовательность данного варианта (стабилизированный и восстановленный белок Env ZM233M (HIV172520) представлена под SEQ ID NO: 35. Данные для этого варианта показаны, например, на фиг. 14 (см. стабилизированный и восстановленный ZM233M на ней), на которой показано очень большое повышение связывания с нейтрализующими антителами широкого спектра действия по сравнению с исходной молекулой Env ZM233M wt.

В белок Env, полученный из штамма из CN97001 клады C, вводили мутации SOSIP. Кроме того, восстанавливали ряд остатков согласно концептуальному остову, описанному в примере 12 и на фиг. 13 (Y187bN, A77T, I232T, V33N, Q354P, E99D, P462N, T185N, T49K, Q105H, N102D, V525A, R132T, E130N, V164E, N477D, T219A; следует отметить: положение 187b является положением, не присутствующим в HXB2: в случае таких остатков буквы обычно добавляют для каждого из вставленных аминокислотных остатков после последней аминокислоты, которая соответствует остатку HXB2, например, 187a, 187b и т. д.), и вводили стабилизирующие замены M535N, L556P, K588E, D589V, N651F, K655I, K658V. Последовательность данного варианта (стабилизированный и восстановленный белок Env CN97001 (HIV172523) представлена под SEQ ID NO: 36. Данные для этого варианта показаны, например, на фиг. 14 (см. стабилизированный и восстановленный CN97001 на ней), на которой показано очень большое повышение связывания с нейтрализующими антителами широкого спектра действия по сравнению с исходной молекулой Env CN97001 wt.

В белок Env, полученный из штамма из ZM246F клады C, вводили мутации SOSIP. Кроме того, восстанавливали ряд остатков согласно концептуальному остову, описанному в примере 12 и на фиг. 13 (S113D, R339N, P63K, K415T, K172E, T153E, S335E, S160N, I303T, K448N, I444T, G347K, Q106E, G293E, I135N), и вводили стабилизирующие замены M535N, L556P, K588E, D589V, N651F, K655I, K658V. Последовательность данного варианта (стабилизированный и восстановленный белок Env ZM246F (HIV172526) представлена под SEQ ID NO: 37. Данные для этого варианта показаны, например, на фиг. 14 (см. стабилизированный и восстановленный ZM246F на ней), на которой показано очень большое повышение связывания с нейтрализующими антителами широкого спектра действия по сравнению с исходной молекулой Env ZM246F wt.

В белок Env из штамма клады C под номером доступа в Genbank ADM30337.1 вводили мутации SOSIP. Кроме того, восстанавливали ряд остатков согласно концептуальному остову, описанному в примере 12 и на фиг. 13 (S72H, D234N, R651N, F602L, Y621D, V413T, V316T, V544L), и вводили стабилизирующие замены M535N, L556P, K588E, D589V, N651F, K655I, K658V. Последовательность данного варианта (стабилизированный и восстановленный белок Env ADM30337.1 (HIV172517) представлена под SEQ ID NO: 38. Данные для этого варианта показаны, например, на фиг. 14 (см. стабилизированный и восстановленный ADM30337.1 на ней), на которой показано очень большое повышение связывания с нейтрализующими антителами широкого спектра действия по сравнению с исходной молекулой Env ADM30337.1 SOSIP wt.

В данном примере продемонстрировано, что способы, описанные в данном документе, можно применять для широкого диапазона различных белков Env HIV, включая белки, которые, как известно, характеризуются очень низкими (т. е. среди заявленных с наиболее низкими) уровнями тримеризации, и что уровни тримеризации таких белков также могут быть намного улучшены, что демонстрирует общую

применимость способов и замен, раскрытых в данном документе, для улучшения тримеризации белков Env HIV.

**Пример 17. Стабилизация штамма клады В с помощью мутации в положении 658**

В ConB\_SOSIP (SEQ ID NO: 5) замена Q658V обеспечивала увеличенный выход тримеров при аналитической SEC с применением супернатантов культуры клеток после трансфекции (фиг. 18), демонстрируя, что 658V обеспечивает увеличение выхода тримеров для клады В, помимо увеличения выходов тримеров для Env клады С и Env клады А, описанного в предыдущих примерах.

**Пример 18. Стабилизирующие мутации в мембраносвязанной консенсусной последовательности С SOSIP**

Клетки HEK293F трансфицировали конструкциями ДНК, экспрессирующими мембраносвязанную полноразмерную (FL) консенсусную последовательность С (ConC) SOSIP (SEQ ID NO: 44), либо со стабилизирующими аминокислотными заменами A204I, I535N, I573F, K588E, D589V, N651F и K655I, либо без них. Через два дня после трансфекции клетки инкубировали с панелью нейтрализующих антител широкого спектра действия и нейтрализующих антител узкого спектра действия (bNAbs и отличные от bNAbs) и выявляли с помощью меченного Alexa Fluor 647 (AF647) вторичного антитела к антителу человека с применением сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Интегрированное среднее значение интенсивности флуоресценции (iMFI) рассчитывали путем умножения частоты встречаемости AF647-положительных клеток на MFI с получением таким образом меры, которая включает как величину, так и качество ответа (например, Darrah PA, et al. Nat Med. 2007, 13(7): 843-50). Данные представлены в виде кратности изменения относительно каркасной конструкции без стабилизирующих мутаций (ConC\_SOSIP\_FL) на фиг. 20. В общем, эффект стабилизирующих мутаций на iMFI bNAbs в мембраносвязанном состоянии, по видимому, является ограниченным, при этом 1 из 10 bNAbs демонстрирует более высокий, и 2 из 10 bNAbs демонстрируют более низкий сигнал по сравнению с каркасной последовательностью. Однако все 8 отличных от bNAbs антител показывают уменьшение iMFI в присутствии стабилизирующих мутаций, демонстрируя преимущественный эффект этих замен в мембраносвязанном состоянии.

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие мембраносвязанные стабилизированные варианты Env ConC\_SOSIP клонировали в векторы на основе аденовируса (серотип 26). Векторы на основе аденовируса, кодирующие мембраносвязанные стабилизированные варианты Env по настоящему изобретению, также можно использовать для вакцинации.

В вышеприведенных примерах продемонстрировано, что в настоящем изобретении представлен универсальный подход для оптимизации сворачивания и стабильности закрытых тримерных белков оболочки HIV до слияния.

Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены только с целью иллюстрации, и что в вышеописанных

вариантах осуществления можно будет выполнять изменения без отступления от их общего изобретательского замысла. Таким образом, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными раскрытыми вариантами осуществления, но предусматривает охват модификаций в рамках сущности и объема настоящего изобретения, определенных в прилагаемых пунктах формулы изобретения.

#### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**SEQ ID NO: 1** gp160 из изолята HXB2 HIV-1 (сигнальная последовательность выделена курсивом; аминокислоты в положениях (i)-(vii) из таблицы 1 выделены серым; аминокислота в положении 658 подчеркнута и выделена жирным шрифтом)

MRVKEKYQHLLWRWGWRWGTMLLGMMLICSATEKLWVTVYYGVPVWKEATTTLF  
CASDAKAYDTEVHNVWATHACVPTDPNPQEVVLNVNTENFNMWKNDMVEQMHEDI  
SLWDQSLKPCVKLTPLCVSLKCTDLKNDTNTNSSSGRMIMEKGEIKNCSFNISTSIRGKV  
QKEYAFFYKLDIIPIDNDTTSYKLTSCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNK  
TFNGTGPCNTVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEVSVIRSVNFTDNAKTIIVQLNTSV  
EINCTRPNNNTRKRIRIQRGPGRAFTIGKIGNMRQAHNCISRAKWNNTLKQIASKLREQ  
FGNNKTIIFKQSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYCNSTQLFNSTWFNSTWSTEGSNNTGSDT  
ITLPCRICKIINMWQKVGKAMYAPPISGQIRCSSNITGLLLTRDGGNSNNESEIFRPGGGD  
MRDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTKAKRRVVQREKRAVGIGALFLGFLGAAGSTMG  
AASMTLTVQARQLLSGIVQQQNLLRAIEAQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKD  
QQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNHTTWMEWDREINNYTSLIHSLEE  
SQNQKEKNEQELLELDKWASLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAVLSIVNR  
VRQGYSPLSFQTHLPTPRGPDRPEGIEEEGGERDRDRSIRLVNGSLALIWDLLRSLCLFSY  
HRLRDLLLIVTRIVELLGRRGWEALKYWWNLLQYWSQELKNSAVSLLNATAIAVAEGT  
DRVIEVVQGACRAIRHIPRRIRQGLERILL

**SEQ ID NO: 2**, консенсусная последовательность Env HIV клады C (только консенсусная последовательность, не включающая никакой сигнальной последовательности, трансмембранный домен (последняя аминокислота 664), мутации SOSIP и/или мутации сайта расщепления фурином; аминокислоты в положениях (i) - (vii) из таблицы 1 выделены серым; аминокислота в положении 658 подчеркнута и выделена жирным шрифтом)

NLWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYEKEVHNVWATHACVPTDPNPQE  
MVLENVTENFNMWKNDMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTNVNVTNTN  
NNNMKEEMKNCSFNNTTTEIRDKKQKEYALFYRLDIVPLNENSSEYRLINCNTSTITQACP  
KVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKTFNGTGPCNNVSTVQCTHGIPVVSTQLLLNGSLA  
EEIIIRSENLTDNAKTIIVHLNESVEINCTRPNNNTRKSIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAH  
CNISEAKWNKTLQRVKKKLKEHFPNKTIKFAPSSGGDLEITTHSFNCRGEFFYCNTSKLF  
NSTYNNTTSNSTITLPCRICKIINMWQEVGRAMYAPPIAGNITCKSNITGLLLTRDGGNN  
NNNTETFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVVEIKPLGIAPTKAKRRVVEREKRRAVGIGAV  
FLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLSGIVQQQSNNLLRAIEAQHMLQLTVWGIKQLQ

ARVLAIERYLKDQQLGIWGCSGKLICTTAVPWNSSWSNKSQEDIWDNMTWMQWDRE  
ISNYTDTIYRLLEESQNQQEKNEKDLLALD

**SEQ ID NO: 3** ConC\_SOSIP (зрелая консенсусная последовательность белков клады C с мутациями SOSIP, а также сайтом расщепления фурином (курсив) и С-концевым усечением; аминокислоты в положениях (i) - (vii) из таблицы 1 выделены серым; аминокислота в положении 658 подчеркнута и выделена жирным шрифтом)

NLWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYEKEVHNVWATHACVPTDPNPQE  
MVLENVTENFNMWKNDMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTNVNVTNTN  
NNNMKEEMKNCSFNNTTTEIRDKKQKEYALFYRLDIVPLNENSSEYRLINCNTSTITQACP  
KVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKTFNGTGPCNNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLNGSLA  
EEEIIRSENLTDNAKTIIVHLNESVEINCTRPNNNTRKSIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAH  
CNISEAKWNKTLQRVKKKLKEHFPNKTIKFAPSSGGDLEITTHSFNCRGEFFYCNTSKLF  
NSTYNNTTSNSTITLPCRQIINMWQEVGRAMYAPPIAGNITCKSNITGLLLTRDGGNN  
NNNTETFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVEIKPLGIAPTKCKRRVVERRRRRRRAVGIGA  
VFLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLSGIVQQSNLLRAPEAQQHMLQLTVWGIKQ  
LQARVLAIERYLKDQQLGIWGCSGKLICTTAVPWNSSWSNKSQEDIWDNMTWMQWD  
REISNYTDTIYRLLEESQNQQEKNEKDLLALD

**SEQ ID NO: 4**, консенсусная последовательность Env HIV клады B (только консенсусная последовательность, не включающая никакой сигнальной последовательности, трансмембранный домен (последняя аминокислота 664), мутации SOSIP и/или мутации сайта расщепления фурином; аминокислоты в положениях (i) - (vii) из таблицы 1 выделены серым; аминокислота в положении 658 подчеркнута и выделена жирным шрифтом)

AEKLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVHNVWATHACVPTDPNPQ  
EVLLENVTENFNMWKNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDLNNNTT  
NNNSSSEKMEKGEIKNCSFNITTSIRDKVQKEYALFYKLDVVPIDNNNTSYRLISCNTSVI  
TQACPKVSEPIPIHYCAPAGFAILKCNDDKKFNGTGPCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLN  
GSLAEVVEVIRSENFTDNAKTIIVQLNESVEINCTRPNNNTRKSIHIGPGRAFATGDIIGDI  
RQAHCNISRTKWNNTLKQIVKKLREQFGNKTIIVFNQSSGGDPEIVMHSFNCGGEFFYCN  
TTQLFNSTWNSNGTWNNTTGNNTITLPCRQIINMWQEVGKAMYAPPIRGQIRCSSNIT  
GLLLTRDGGNNNNNTTETFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTKCKRRRV  
QRRRRRRRAVGIGAMFLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLSGIVQQNNLLRAPEAQ  
QHLLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLKDQQLGIWGCSGKLICTTAVPWNTSWSNKS  
LD EIWDNMTWMQWEREIDNYTGLIYTLIEESQNQQEKNEQELLELD

**SEQ ID NO: 5** ConB\_SOSIP (зрелая консенсусная последовательность белков клады B с мутациями SOSIP, а также сайтом расщепления фурином (курсив) и С-концевым усечением; аминокислоты в положениях (i) - (vii) из таблицы 1 выделены серым; аминокислота в положении 658 подчеркнута и выделена жирным шрифтом)

AEKLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVHNVWATHACVPTDPNPQ  
EVLLENVTENFNMWKNNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDLNNNTT



NNNSSEKMEKGEIKNCSFNITTSIRDKVQKEYALFYKLDVVPIDNNNTSYRLISCNTSVI  
TQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNDKKFNGTGPCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLN  
GSLAEEEVVIRSENFTDNAKTIIVQLNESVEINCTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYATGDIIGDI  
RQAHCNISRTKWNNTLKQIVKKLREQFGNKTIVFNQSSGGDPEIVMHSFNCGGEFFYCN  
TTQLFNSTWNSNGTWNNTTGNdTITLPCRIKQIINMWQEVGKAMYAPPIRGQIRCSSNIT  
GLLLTRDGGNNNNNTTETFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTCKRRRVV  
QRRRRRRRAVGIGAMFLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAPEAQQ  
HLLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLKDQQLLGIWGC SGKLICTAVPWNTSWSNKSLDE  
IWDNMTWMQWEREIDNYTGLIYTLIEESQNQQEKNEQELLELD

**SEQ ID NO: 6** фрагмент C4 синтетического белка оболочки Env HIV Mos2S;  
аминокислоты в положениях (i) - (vii) из таблицы 1 выделены серым)

MGNLWVTVYYGVPVWKDAKTTLFCASDAKAYEKEVHNVWATHACVPTDPNP  
QEIVLGNVTENFNMWKNDMVDQM HEDIISLWDASLEPCVKLTPLCVTLNCRNVRNVSS  
NGTYNIIHNETYKEMKNCSFNATTVVEDRKQKVHALFYRLDIVPLDENNSSEKSSSENSSE  
YYRLINCNTSAITQACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNNKTFNGTGPCNNVSTVQCTH  
GIKPVVSTQLLNGLAEIIIIRSENLTNNAKTIIVHLNETVNITCTRPNNNTRKSIRIGPG  
QTFYATGDIIGDIRQAHCNLSRDGWNKTLQGVKKKLAEHFPNKTIKFAPHSGGDLEITTH  
TFNCRGEFFYCNTSNLFNESNIERNDSIITLPCRIKQIINMWQEVGRAIYAPPIAGNITCRSN  
ITGLLLTRDGGSNNGVPNDTETFRPGGGDMRNNWRSELYKYKVVEVKPLGVAPTEAKR  
RVVEREKRAVGIGAVFLGILGAAGSTMGAASITLTVQARQLLSGIVQQQSNLLRAIEAQ  
QHMLQLTVWGIKQLQTRVLAIERYLQDQQLLGLWGCSGKLICTAVPWNTSWSNKSQT  
DIWDNMTWMQWDKEIGNYTGEIYRLLEESQNQQEK

**SEQ ID NO: 7** (последовательность DS\_sC4\_SOSIP\_E166R; аминокислоты в  
положениях (i) - (vii) из таблицы 1 выделены серым)

MGNLWVTVYYGVPVWKDAKTTLFCASDAKAYEKEVHNVWATHACVPTDPNP  
QEIVLGNVTENFNMWKNDMVDQM HEDIISLWDASLEPCVKLTPLCVTLNCRNVRNVSS  
NGTYNIIHNETYKEMKNCSFNATTVVRDRKQKVHALFYRLDIVPLDENNSSEKSSSENS  
EYYRLINCNTSACTQACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNNKTFNGTGPCNNVSTVQCT  
HGIKPVVSTQLLNGLAEIIIIRSENLTNNAKTIIVHLNETVNINCTRPNNNTRKSIRIGP  
GQTFYATGDIIGDIRQAHCNLSRDGWNKTLQGVKKKLAEHFPNKTIKFAPHSGGDLEITT  
HTFNCRGEFFYCNTSNLFNESNIERNDSIITLPCRIKQIINMWQEVGRCIYAPPIAGNITCRS  
NITGLLLTRDGGSNNGVPNDTETFRPGGGDMRNNWRSELYKYKVVEVKPLGVAPTECK  
RRVVERRRRRRRAVGIGAVFLGILGAAGSTMGAASITLTVQARQLLSGIVQQQSNLLRAP  
EAQQHMLQLTVWGIKQLQTRVLAIERYLQDQQLLGLWGCSGKLICTAVPWNTSWSN  
KSQTDIWDNMTWMQWDKEIGNYTGEIYRLLEESQNQQEK

**SEQ ID NO: 8 (Mos1.Env,** последовательность мозаичного белка оболочки HIV;  
аминокислоты в положениях (i) - (vii) из таблицы 1 выделены серым)

AGKLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVHNVWATHACVPTDPNPQ  
EVLLENVTENFNMWKNNMVEQM HEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDDVRNVT  
NNATNTNSSWGEPMEKGEIKNCSFNITTSIRNKVQKQYALFYKLDVVPIDNDSNNTNYR

LISCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNDKKFNGTGPCTNVSTVQCTHGIRPV  
VSTQLLLNGLSLAESEVVIRSENFTNNAKTIMVQLNVSVENCTRPNNNTRKSIHIGPGRAF  
YTAGDIIGDIRQAHCNISRWNNNTLRQIVEKLGKQFGNNKTIVFNHSSGGDPEIVMHSF  
NCGGEFFYCNSTKLFNSTWTWNNSTWNNTKRSNDTEEHITLPCRIKQIINMWQEVGKA  
MYAPPIRGQIRCSSNITGLLLTRDGGNDTSGTEIFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKIEP  
LGVAPTKAKRRVVQSEKSAVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARLLLSGIVQQ  
QNNLLRAIEAQHLLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLKDQQLLGIWGC SGKLICTTTVP  
WNASWSNKS LDKIWNMTWMEWEREINNYTSLIYTLIEESQNQQEK

**SEQ ID NO: 9** (Mos2.Env, последовательность мозаичного белка оболочки HIV; аминокислоты в положениях (i) - (vii) из таблицы 1 выделены серым)

MGNLWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYEKEVHNWVATHACVPTDPNP  
QEMVLENTENFNMWKNDMVDQM HEDIIRLWDQSLKPCVKLTPLCVTLECRNVRNVS  
SNGTYNIIHNETYKEMKNCSFNATTVVEDRKQKVHALFYRLDIVPLDENNSSEKSSSENS  
EYYRLINCNTSAITQACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNNKTFNGTGPCNNVSTVQCT  
HGIKPVVSTQLLLNGLSLAESEIIIRSENLTNNAKTIIVHLNETVNITCTRPNNNTRKSIRIGP  
GQTFYATGDIIGDIRQAHCNLSRDGWNKTLQGVKKKLAEHFPNKTINFTSSSGGDLEITT  
HSFNCRGEFFYCNSTGLFNGTYMPNGTNSNSSSNITLPCRIKQIINMWQEVGRAMYAPPI  
AGNITCRSNITGLLLTRDGGSNNGVPNDTETFRPGGGDMRNNNRSELYKYKVVVEVKPL  
GVAPTEAKRRVVEREKRAVGIGAVFLGILGAAGSTMGAASITLTVQARQLLSGIVQQQS  
NLLRAIEAQHMLQLTVWGIKQLQTRVLAIERYLQDQQLLGLWGC SGKLICTTAVPWN  
TSWSNKSQTDIWDNMTWMQWDKEIGNYTGEIYRLLEESQNQQEK

**SEQ ID NO: 10** (мутантная последовательность сайта расщепления фурином)

RRRRRR

**SEQ ID NO: 11** (пример сигнальной последовательности (например, применяемой в случае ConC\_SOSIP и некоторых вариантов, полученных из последовательности дикого типа))

MRVRGILRNWQQWWIWGILGFWMLMICNVVG (следует отметить: последние VG могут быть началом зрелого белка или концом сигнальной последовательности)

**SEQ ID NO: 12** (пример последовательности из 8 аминокислот, которая может замещать петлю HR1)

NPDWL PDM

**SEQ ID NO: 13** (пример последовательности из 8 аминокислот, которая может замещать петлю HR1)

GSGSGSGS

**SEQ ID NO: 14** (пример последовательности из 8 аминокислот, которая может замещать петлю HR1)

DDVHPDWD

**SEQ ID NO: 15** (пример последовательности из 8 аминокислот, которая может замещать петлю HR1)

RDTFALMM

**SEQ ID NO: 16** (пример последовательности из 8 аминокислот, которая может замещать петлю HR1)

DEEKVMDF

**SEQ ID NO: 17** (пример последовательности из 8 аминокислот, которая может замещать петлю HR1)

DEDPHWDP

**SEQ ID NO: 18** (пример сигнальной последовательности (например, применяемой в случае ConB\_SOSIP))

MRVKGIRKNYQHLWRWGTMLLGMLMISCA

**SEQ ID NO: 19** (метка, применяемая для конструкций gp140 HIV в анализе AlphaLISA)

AAALPETGGGSDYKDDDDKPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG  
GGSHHHHHH

**SEQ ID NO: 20** (стабилизированный ConC\_SOSIP, 'ConC\_SOSIP\_7mut' (HIV160544))

NLWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYEKEVHNVWATHACVPTDPNPQE  
MVLENVTENFNMWKNDMVDQMHEIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTNVNVTNTN  
NNNMKEEMKNCSFNNTTEIRDKKQKEYALFYRLDIVPLNENSSEYRLINCNTSTITQICPK  
VSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNNKTFNGTGPCNNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLNGSLAE  
EEIIRSENLTDNAKTIIVHLNESVEINCTRPNNNTRKSIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHC  
NISEAKWNKTLQRVKKKLKEHFPNKTIKFAPSSGGDLEITTHSFNCRGEFFYCNTSKLFN  
STYNNTTSNSTITLPCRIKQIINMWQEVGRAMYAPPIAGNITCKSNITGLLLTRDGGNNN  
NNTETFRPGGDMRDNRSELYKYKVVEIKPLGIAPTCKKRRVVERRRRRRRAVGIGAV  
FLGFLGAAGSTMGAASnTLTVQARQLLSGIVQQQSNLLRAPEAQQHMLQLTVWGFQKL  
QARVLAIERYLEvQQLLGIWGC SGK LICCTAVPWNSSWSNKSQEDIWDNMTWMQWDR  
EISNYTDTIYRLLEESQfQQEiNEKDLLALD

**SEQ ID NO: 21** (белок Env BG505\_SOSIP (HIV150673))

AENLWVTVYYGVPVWKDAETTLFCASDAKAYETEKHNVWATHACVPTDPNPQ  
EIHLENVT EEFNMWKNNMVEQMHTDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLQCTNVNNTND  
DMRGELKNCSFNMTTEL RDKKQKVYSLFYRLDVVQINENQGNRSNNSNKEYRLINCNT  
SAITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCKDKKFNGTGPCPSVSTVQCTHGIKPVVSTQL  
LLNGSLAE EEEVMIRSENITNNAKNILVQFNTPVQINCTRPNNNTRKSIRIGPGQAFYATGD  
IIGDIRQAHCNVSKATWNETLGKVVKQLRKHFNGNTIIRFANSSGGDLEVTTTHSFNCGGE  
FFYCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSITLPCRIKQIINMWQRIGQAMYAPPIQGV  
RCVSNITGLILTRDGGSTNSTTETFRPGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTRCK  
RRVVGRRRRRRAVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARNLLSGIVQQQSNLLRA  
PEAQQHLLKLT VWGIKQLQARVLAVERYLRDQQLLGIWGC SGK LICCTNVPWNSSWSN  
RNLSEIWDNMTWLQWDKEISNYTQIIYGLLEESQNQQEKNEQDLLALD

**SEQ ID NO: 22** (стабилизированный белок Env BG505\_SOSIP (HIV170863))

AENLWVTVYYYGVPVWKDAETTLFCASDAKAYETEKHNWATHACVPTDPNPQ  
 EIHLENVTEEFNMWKNNMVEQMHTDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLQCTNVNTNITD  
 DMRGELKNCSFNMTTELDRDKKQKVYSLFYRLDVVQINENQGNRSNNSNKEYRLINCNT  
 SAITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCKDKKFNGTGPCPSVSTVQCTHGIKPVVSTQL  
 LLNGSLAE EVMIRSENITNNAKNILVQFNTFPVQINCTRPNNNTRKSIRIGPGQAFYATGD  
 IIGDIRQAHCNVSKATWNETLGKVVKQLRKHFNGNTIIRFANSSGGDLEVTTHSFNCGGE  
 FFYCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSITLPCRIKQIINMWQRIGQAMYAPPIQGV  
 RCVSNITGLILTRDGGSTNSTTETFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTRCK  
 RRVVGRRRRRRAVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAAS<sub>n</sub>TLTVQARNLLSGIVQQQSNL<sub>p</sub>RAP  
 EAQQHLLKLTWVGKQLQARVLAVERYLR<sub>v</sub>QQLLGIWGCSGKLICCTNVPWNSSWSNR  
 NLSEIWDNMTWLQWDKEISNYTQIIYGLLEESQ<sub>f</sub>QQE<sub>i</sub>NEQDLLALD

**SEQ ID NO: 23** (белок Env C97ZA\_SOSIP wt с L535M и Q567K (HIV150673))

NMWVTVYYYGVPVWTDAKTTLFCASDTKAYDREVHNWATHACVPTDPNPQEIV  
 VLENVTENFNMWKNDMVDQMHEIDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLHCTNATFKNNVT  
 NDMNKEIRNCSFNNTTTEIRDKKQQGYALFYRPDIVLLKENRNNSNNSSEYILINCNASTITQ  
 ACPKVNFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKTFSGKGPCNNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNG  
 SLAEKEIIIRSENLTDNVKTIIVHLNKSVEIVCTRPNNNTRKSMRIGPGQTFYATGDIIGDIR  
 QAYCNISGSKWNETLKRVEKQLQENYNNNKTIKFAPSSGGDLEITTHSFNCRGEFFYCN  
 TTRLFNNNATEDETITLPCRIKQIINMWQGVGRAMYAPPIAGNITCKSNITGLLLVRDGG  
 EDNKTEEIFRPGGGNMKDNWRSELYKYKVIELKPLGIAPT<sub>Gc</sub>KRRVVER<sub>rrrr</sub>RAVGIGAV  
 FLGFLGAAGSTMGAAS<sub>m</sub>TLTVQARQLLSSIVQQQSNLLRA<sub>p</sub>EAQQHMLkLTWVGKQL  
 QTRVLAIERYLKDQQLLGIWGCSGKLIC<sub>c</sub>TNVPWNSSWSNKSQTDIWNNMTWMEWDR  
 EISNYTDTIYRLLEDSTQ<sub>f</sub>QQEKNEKDLLALD

**SEQ ID NO: 24** (восстановленный и стабилизированный белок Env C97ZA\_SOSIP (HIV170690))

NIWVTVYYYGVPVWkDAKTTLFCASDaKAYDREVHNWATHACVPTDPNPQEIV  
 LENVTENFNMWKNDMVDQMHEIDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLHCTNATFKNNVTN  
 DMNKEIRNCSFNNTTTEIRDKKQ<sub>kv</sub>YALFYRIDIV<sub>q</sub>LKENRNNSNNSSEY<sub>r</sub>LINCNT<sub>t</sub>STITQ<sub>i</sub>CP  
 KV<sub>t</sub>FDPIPIHYCAPAGYAILKCNKTF<sub>Fn</sub>GtGPCNNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAE  
 KEIIIRSENLTDNVKTIIVHLNKSVEI<sub>n</sub>CTRPNNNTRKS<sub>i</sub>RIGPGQTFYATGDIIGDIRQAYC  
 NISGSKWNETLKRVEKEL<sub>r</sub>Eh<sub>f</sub>NNNKTIKFAPSSGGDLEITTHSFNCRGEFFYCN<sub>t</sub>TTRLFN  
 NNATEnETITLPCRIKQIINMWQ<sub>e</sub>VGRAMYAPPIAGNITCKSNITGLLL<sub>t</sub>IRDGGEDNKTEEI  
 FRPGGGNMKDNWRSELYKYKV<sub>v</sub>EiKPLGIAPT<sub>k</sub>cKRR<sub>n</sub>VtR<sub>rrrr</sub>RAVGIGAVFLGFLGAAG  
 STMGAAS<sub>n</sub>TLTVQARQLL<sub>Sg</sub>IVQQQSNL<sub>p</sub>RA<sub>p</sub>EAQQHMLkLTWVGKQLQ<sub>a</sub>RVLAIERYL  
 evQQLLGIWGCSGKLIC<sub>c</sub>TNVPWNSSWSNKSQTDIWNNMTWMEWDREISNYTDTIYRL  
 EDSQ<sub>f</sub>QQE<sub>i</sub>NEKDLLAnD

**SEQ ID NO: 25** (вариант восстановленной и стабилизированной конструкции Du422 (HIV161818))

NLWVTVYYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYDKEVHNWATHACVPTDPNPQEIV  
 VLENVTENFNMWKNDMVDQMHEIDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCKNVNISANAN

ATATLNSSMNGEIKNCSFNTTTEL RDKKQKVYALFYKPDVVPLNGGEHNETGEYILINC  
 NSSTcTQACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNNKTFNGTGPCNNVSTVQCTHGIKPVVST  
 QLLNGSLAEEEEIIIRSENLTNNIKTIIVHLNKSVEINCTRPNNNTRKSVRIGPGQTFYATGE  
 IIGDIREAHCNISRETWNSTLIQVKEKLREHYNKTIFEPSSGGDLEVTTHSFNCRGEFFYC  
 NTKLKFNETKLFNESEYVDNKTIIILPCRIKQIINMWQEVGRcMYAPPIEGNITCKSNITGLL  
 LTRDGGENSTEEVFRPGGGNMKDNWRSELYKYKVVEIKPLGVAPTCKCKRKnVtRRRRR  
 RAVGLGAVLLGFLGAAGSTMGAASnTLTVQARQLLSGIVQQQSNLpRAPEAQQHLLQL  
 TVWGIKQLQTRVLAIERYLKvQQLLGLWGCSGKLICCTAVPWNSSWSNKS LGDIWDNM  
 TWMQWDREISNYTNTIYRLLEDSQfQQEKNEKDLLAnD

SEQ ID NO: 26 (восстановленный и стабилизированный Du422\_SOSIP  
 (HIV170859))

NLWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYDKEVHNVWATHACVPTDPNPQEI  
 VLENVTENFNMWKNDMVDQM HEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCKNVNISANAN  
 ATATLNSSMNGEIKNCSFNTTTEL RDKKQKVYALFYKPDVVPLNGGEHNETGEYILINC  
 NSSTITQACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNNKTFNGTGPCNNVSTVQCTHGIKPVVST  
 QLLNGSLAEEEEIIIRSENLTNNIKTIIVHLNKSVEINCTRPNNNTRKSVRIGPGQTFYATGE  
 IIGDIREAHCNISRETWNSTLIQVKEKLREHYNKTIFEPSSGGDLEVTTHSFNCRGEFFYC  
 NTKLKFNETKLFNESEYVDNKTIIILPCRIKQIINMWQEVGRAMYAPPIEGNITCKSNITGL  
 LLTRDGGENSTEEVFRPGGGNMKDNWRSELYKYKVVEIKPLGVAPTCKCKRKVVGRRR  
 RRRRAVGLGAVLLGFLGAAGSTMGAASnTLTVQARQLLSGIVQQQSNLpRAPEAQQHLL  
 QLTWVGKQLQTRVLAIERYLEvQQLLGLWGCSGKLICCTAVPWNSSWSNKS LGDIWDN  
 MTWMQWDREISNYTNTIYRLLEDSQfQQEiNEKDLLALD

SEQ ID NO: 27 (восстановленный и стабилизированный DS\_sC4\_SOSIP  
 (HIV170686))

MGNLWVTVYYGVPVWKDAKTTLFCASDAKAYEKEVHNVWATHACVPTDPNP  
 QEIVLGNVTENFNMWKNDMVDQM HEDIISLWDqSLkPCVKLTPLCVTLNCRNVRNVEM  
 KNCSFNATTVVrDRKQKVHALFYRLDIVPLDENNSSYRLINCNTSAcTQiCPKVSFDPIPIH  
 YCAPAGYAILKCNNKTFNGTGPCNNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLNGSLAEEEEIIIRSEN  
 TNNAKTIIVHLNETVNINCTRPNNNTRKSIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHCNLSRDGWN  
 KTLQGVKKKLAEHFPNKTIFAPHSGGDLEITThsFNCRGEFFYCNTSNLNFESNIERNDS  
 IITLPCRIKQIINMWQEVGRcmYAPPIAGNITCRSNITGLLLTRDGGSSNNNDTETFRPGGGD  
 MRNNWRSELYKYKVVEVKPLGVAPTECKRRRVERRRRRRRAVGIGAVFLGILGAAGST  
 MGAASnTLTVQARQLLSGIVQQQSNLpRAPEAQQHMLQLTVWGIKQLQTRVLAIERYLE  
 vQQLLGLWGCSGKLICCTAVPWNTSWSNKSQTDIWDNMTWMQWDKEIGNYTGEIYRL  
 LEESQfQQEi

SEQ ID NO: 28 (стабилизированный ConC\_SOSIP.v3 (HIV170654))

NLWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYEKEVHNVWATHACVPTDPNPQE  
 MVLENVTENFNMWKNDMVDQM HEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTNVNVTM  
 KNCSFNTTTEIRDKKQKEYALFYRLDIVPLNENSSEYRLINCNTSTITQICPKVSFDPIPIHY  
 CAPAGYAILKCNNKTFNGTGPCNNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLNGSLAEEEEIIIRSENLT

NNVKTIIVHLNESVEIVCTRPNNNTRKSIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHCNISEAKWNK  
 TLQRVKKKLKEHFPNKTIKFQPSSGGDLEITTHSFNCRGEFFYCNTSKLFNSTYNNTTSNS  
 TITLPCRICKIINMWQEVGRAMYAPPIAGNITCKSNITGLLLTRDGGNNNNNTETFRPGG  
 GDMRDNWRSELYKYKVVEIKPLGIAPTCKRRVVERRRRRRRAVGIGAVFLGFLGAAGS  
 TMGAASNTLTVQARQLLSGIVQQQSNLLRAPEAQQHMLQLTVWGFQQLQARVLAIERY  
 LEVQQLLGIWGC SGK LICCTAVPWNSSWSNKSQEDIWDNMTWMQWDREISNYTDTIYR  
 LLEESQFQQEINEKDLLALD

SEQ ID NO: 29 (стабилизированный BG505\_SOSIP.v2 (HIV171814))

AENLWVTVYYGVPVWKDAETTLFCASDAKAYETEKHNWATHACVPTDPNPQ  
 EIHLENVTEEFNMWKNNMVEQMHTDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLQCTNVNTNITD  
 DMRGELKNCSFNMTTEL RDKKQKVYSLFYRLDVVQINENQGNRSNNSNKEYRLINCNT  
 SAcTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCKDKKFNGTGPCPSVSTVQCTHGIKPVVSTQL  
 LLNGSLAEEEEVMIRSENITNNAKNILVQFNTVPVQINCTRPNNNTRKSIRIGPGQAFYATGD  
 IIGDIRQAHCNVSKATWNETLGKVVKQLRKHFNGNTIIRFANSSGGDLEVTTHSFNCGGE  
 FFYCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSITLPCRICKIINMWQRIGQcMYAPPIQGVIR  
 CVSNTGLILTRDGGSTNSTTETFRPGGGDMRDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTRCKR  
 RVVGRRRRRRAVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAASnTLTVQARNLLSGIVQQQSNLpRAPE  
 AQQHLLKLTWVGKQLQARVLAVERYLevQQLLGIWGC SGK LICCTNVPWNSSWSNRN  
 LSEIWDNMTWLQWDKEISNYTQIYGLLEESQfQQEiNEvDLLALD

SEQ ID NO: 30 (восстановленный и стабилизированный C97ZA\_SOSIP.v2 (HIV171810))

NIWVTVYYGVPVWkDAKTTLFCASDaKAYDREVHNWATHACVPTDPNPQEIV  
 LENVTENFNMWKNDMVDQMHEIDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLHCTNATFKNNVTN  
 DMNKEIRNCSFNNTTTEIRDKKQkvYALFYRIDIVqLKENRNNSNNSEYrLINCNTSTcTQiCP  
 KVtFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKTFnGtGPCNNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAE  
 KEIIRSENLTDNVKTIIVHLNKSVEInCTRPNNNTRKSiRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAYC  
 NISGSKWNETLKRvKEKLrEhfNNNKTIKFAPSSGGDLEITTHSFNCRGEFFYCNTTRLFN  
 NNATEnETITLPCRICKIINMWQeVGRcMYAPPIAGNITCKSNITGLLLtRDGGEDNKTEEIF  
 RPGGGNMKDNWRSELYKYKVvEiKPLGIAPTkcKRRnVtRrrrrRAVGIGAVFLGFLGAAGS  
 TMGAASnTLTVQARQLLSgIVQQQSNLpRApEAQQHMLkLTWVGKQLQaRVLAIERYLE  
 vQQLLGIWGC SGK LICcTNVPWNSSWSNKSQTDIWNMTWMEWDREISNYTDTIYRLL  
 EDSQfQQEiNEvDLLAnD

SEQ ID NO: 31 (восстановленный и стабилизированный Du422\_SOSIP.v1 (HIV171812))

NLWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYDKEVHNWATHACVPTDPNPQEIV  
 VLENVTENFNMWKNDMVDQMHEIDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCKNVNISANAN  
 ATATLNSSMNGEIKNCSFNNTTEL RDKKQKVYALFYKPDVVPLNGGEHNETGEYILINC  
 NSSTcTQACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNKTFNGTGPCNNVSTVQCTHGIKPVVST  
 QLLNGSLAEEEEIIRSENLTNNIKTIIVHLNKSVEINCTRPNNNTRKSVRIGPGQTFYATGE  
 IIGDIREAHCNISRETWNSTLIQVKEKLREHYNKTIKFEPSSGGDLEVTTHSFNCRGEFFYC

NTTKLFNETKLFNESEYVDNKTIIILPCRIKQIINMWQEVGR<sub>c</sub>MYAPPIEGNITCKSNITGLL  
LTRDGGENSTEEVFRPGGGNMKDNWRSELYKYKVVEIKPLGVAPTCKCKRKVVGRRRR  
RRAVGLGAVLLGFLGAAGSTMGAAS<sub>n</sub>TLTVQARQLLSGIVQQQSNL<sub>p</sub>RAPEAQQHLLQ  
LTVWGIKQLQTRVLAIERYLE<sub>v</sub>QQLLGLWGCSGKLICCTAVPWNSSWSNKS LGDIWDN  
MTWMQWDREISNYTNTIYRLLED SQfQQEiNE<sub>v</sub>DLLALD

SEQ ID NO: 32 (стабилизированный и восстановленный sC4\_SOSIP.v4)

MGNLWVTVYYGVPVWKDAKTTLFCASDAKAYEKEVHN<sub>v</sub>WATHACVPTDPNP  
QEIVLGNVTENFNMWKNDMVDQM HEDIISLWD<sub>q</sub>SLkPCVKLTPLCVTLNCRNVRNVEM  
KNCSFNATTVV<sub>r</sub>DRKQKVHALFYRLDIVPLDENNSSYRLINCNTSAcTQiCPKVSFDPIPIH  
YCAPAGYAILKCNNKTFNGTGPCNNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLNGSLAEEEEIIIRSEN  
TNNAKTIIIVHLNETVNIVCTRPNNNTRKSIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHCNLSRDGWN  
KTLQGVKKKLAEHFPNKTIKFAPHSGGDLEITTh<sub>s</sub>FNCRGEFFYCNTSNL FNESNIERNDS  
IITLPCRIKQIINMWQEVGR<sub>cm</sub>YAPPIAGNITCRSNITGLLLTRDGGSSNNNDTETFRPGGGD  
MRNNWRSELYKYKVVEVKPLGVAPTECKRR<sub>n</sub>VtRRRRRRRAVGIGAVFLGILGAAGSTM  
GAAS<sub>n</sub>TLTVQARQLLSGIVQQQSNL<sub>p</sub>RAPEAQQHMLQLTVWGIKQLQTRVLAIERYLE<sub>d</sub>  
QQLLGLWGCSGKLICCTAVPWNTSWSNKSQTDIWDNMTWMQWDKEIGNYTGEIYRLL  
EESQfQQEi

SEQ ID NO: 33 (пример сигнальной последовательности (например, применяемой в случае вариантов DS\_sC4\_SOSIP))

MRVRGMLRNWQQWWIWSSLGFWMLMIYSV

SEQ ID NO: 34 (пример сигнальной последовательности (например, применяемой в случае вариантов BG505\_SOSIP))

MRVMGIQRNCQHLFRWGT MILGMIHCSA

SEQ ID NO: 35 (стабилизированный и восстановленный ZM233M\_SOSIP (HIV172520))

SLWVTVYYGVPVWREAKTTLFCASDAKAYETE<sub>v</sub>H<sub>n</sub>VWATHACVPTDPNPQEM  
VLENV TENFNMWKNDMVDQM HEDVISIWDQSLKPCVKLTPLCVTL<sub>n</sub>CST<sub>v</sub>NNTHNIS<sub>e</sub>E  
MK<sub>n</sub>CSFNMTTEL RDKKRKVN<sub>a</sub>LFYKLDiVPLTNSSNTTNYRLInCNTSTITQACPKVSFD  
PIPIHYCAPAGYAILKCNNKTFNGTGPCNNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLNGSLAEEEEIIIRs  
ENLTDNVKIIIVQLNETINITCTRPNNNTRKSIRIGPGQtFYATGEIiGNIREAHCNIS<sub>e</sub>SKWN  
KTLERVRkKLKEHFPNKTI EFEPSSGGDLEITTh<sub>s</sub>FNCGGGEFFYCNTSGLFNStyNGTsTSNi  
TLPCRIKQIINMWQEVGRAMYAPPIAGNITCKSNITGLLLTRDGGENSS<sub>n</sub>TTETFRPgGGD  
MK<sub>d</sub>NWRSELYKYKVVEIKPLGIAPTEcKRRVVERRRRRRRAVGIGAVFLGFLGAAGSTMG  
AAS<sub>n</sub>TLTVQARQLLSGIVQQQSNL<sub>p</sub>KA<sub>p</sub>EAQQHMLQLTVWGIKQLQARVLAIERYLE<sub>v</sub>Q  
QQLLGLWGCSGKLIC<sub>c</sub>TNVPWNsSWSNKS KNDIWDNMTWMQWDREISNyTDTIYRLLED  
SQfQQEiNE<sub>v</sub>DLLALD

SEQ ID NO: 36 (стабилизированный и восстановленный CN97001\_SOSIP (HIV172523))

nGNLWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYDTEVHN<sub>v</sub>WATHACVPtDPNPQE  
MVLENV TENFNMWKNdMVdQMhEDVISLWDQSLKPCVKLTPLCVTL<sub>n</sub>CtNVSSNSNDT

YHETYHESMKEMKNCSFNATTeVRDRKQTVYALFYRLDIVPLnKKNnSENSSEYYRLIN  
 CNTSAITQACPKVTFDPIPIHYCaPAGYAILKCNDKtFNGTGPCNNVSTVQCTHGIKPVVS  
 TQLLLNGSLAEGEIIRSENLTNNVKTIIVHLNQSV EIVCTRPGNNTRKSIRIGPGQTfYAT  
 GDIIGDIRQAHCNISEDKWN ETLQRVSKKLAEHFpNKTIKFASSSGGDLEVTTHSFNCRG  
 EFFYCNTSGLFN GTYTPNGTKSNSSSIITIPCRIKQIINMWQEVGRAMYAPPIKGNITCKSN  
 ITGLLLVRDGGTE nNDTETFRPGGGDMRdNWRSELYKYKVVEIKPLGVAPTTcKRRVVE  
 RRRRRRAVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLSGIVQQQSNLpRApEAQQH  
 LLQLTVWGIKQLQTRVLAIERYLEvQQLLGIWGCSGKLICcTAVPWNSSWSNKSQEDIWD  
 NMTWMQWDREISNYTDTIYRLLEESQfQQEiNEvDLLALD

SEQ ID NO: 37 (стабилизированный и восстановленный ZM246F\_SOSIP  
 (HIV172526))

NLWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYDkEVHNVWATHACVPTDPNPQEM  
 FLENV TENFNMWKNDMVEQMHeDIISLWdQSLKPCVKLTPLCVTLNCSDVINSTGeMKN  
 CSFnVTTELDRDKQKeHALFYRLDIVPLDENDNSSKDYRLINCNTSTITQACPKVTFDPIPI  
 HYCAPAGYAILKCNNKTFNGTGPCNNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAE EEEVIIRSE  
 NLTDNVKTIIVQLKEPVeINCTRPNNNtRQSIRIGPGQTF FATGDIIGDIREAHCNISeTKWn  
 ETLQQVGkKLAKYFN NKTIKFTQHSGGDLEITTHSFNCRGEFFYCNTS QLFNSTYNETGSI  
 NGTGNSTItLPCRIKQIINMWQGVGQAMYAPPIAGNI tCRSnITGLLLTRDGGINKSEEIFRP  
 GGGNMKDNWRSELYKYKVVEIKPLGVAPTKcKRRVVERRRRRRRAVVGLGAVFLGFLG  
 AAGSTMGAASnTLTVQARQLLSGIVQQQNNLpRApEAQQHMLQLTVWGIKQLQARVLA  
 IERYLevQQLLGIWGCSGKLICcTAVPWNSSWSNKSQEDIWDNMTWMQWDREISNYTNT  
 IYRLLEDSQfQQEiNEvDLLALD

SEQ ID NO: 38 (стабилизированный и восстановленный ADM30337.1\_SOSIP  
 (HIV172517))

VGNLWVTVYYGVPVWKEAKTTLFCASDAKAYDKEVHNVWATHACVPTDPNPQ  
 EMVLENV TENFNMWKNDMVDQMHEdVISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTNVNNNM  
 TNVSINNMTGEITNCSFNITTELDRDKRRQVYALFYRLDIVPLDSNSSEYRLINCNTSTVT  
 QACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNNKTFnGTGPCNNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLL N  
 GSLAEKEIIRSENLTNNAKTIIVHLNESIEINCTRPNNNTRKSVRIGPGQtFYATGDIIGDIR  
 QAHCNISESKWNETLQKVGGKKLQEHFPNKTIKFAPPSGGDLEITTHSFNCRGEFFYCNTS  
 KLFNSTYMHNGTTGNSSGtITLPCKIKQIINMWQEVGRAMYAPPIAGNITCESNITGLLLT  
 RDGGTTNDTSETFRPGGGDMRDNWRSELYKYKVVEIKPLGVAPT GCKRRVVERRRRRR  
 AVGIGAVLLGFLGAAGSTMGAASnTLTVQARQILSGIVQQQSNLpRAPEAQQHMLQLTV  
 WGIKQLQARVLAIERYLEvQQLLGIWGCSGKIICCTNVPWNSSWSNRTQEdIWDNMTWM  
 QWDREINNYTNTIYSLLEESQfQQEiNEvDLLALD

SEQ ID NO: 39 (пример сигнальной последовательности (например, применяемой в  
 случае ZM233M))

MRVRGIMRNWQQWWIWGSLGFWMLIICNVnG

SEQ ID NO: 40 (пример сигнальной последовательности (например, применяемой в  
 случае CN97001))



MRVTGIRKNYRHLWRWGTMLLGMLMISSA

SEQ ID NO: 41 (пример сигнальной последовательности (например, применяемой в случае ZM246F))

MRVMGILRNCQQWWIWSILGFLMIYSVIG

SEQ ID NO: 42 (пример сигнальной последовательности (например, применяемой в случае ADM30337.1))

MRVRGILRNYPQWWIWGILGFWMMLMNCNG

SEQ ID NO: 43 (пример сигнальной последовательности (например, применяемой в случае C97ZA))

MRVRGIPRNWPQWWMWGILGFWMIIICRVVG

SEQ ID NO: 44 (полноразмерный ConC\_SOSIP (включая сигнальную последовательность, курсивом))

MRVRGILRNWQQWWIWGILGFWMLMICNVVGNLWVTVYYGVPVWKEAKTTLFC  
 ASDAKAYEKEVHNWATHACVPTDPNPQEMVLENTENFNMWKNDMVDQMHEDIIS  
 LWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTNVNVTNTNNNNMKEEMKNCSFNTTTEIRDKKQKEY  
 ALFYRLDIVPLNENSSEYRLINCNTSTITQACPKVSFDPIPIHYCAPAGYAILKCNNKTFNG  
 TGPCNNVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAEEEEIIIRSENLTDNAKTIIVHLNESVEINCT  
 RPNNNTRKSIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHCNISEAKWNKTLQRVKKKLKEHFPNKTI  
 KFAPSSGGDLEITTHSFNCRGEFFYCNTSKLFNSTYNNNTTSNSTITLPCRICKIINMWQEV  
 GRAMYAPPIAGNITCKSNITGLLLTRDGGNNNNNTETFRPGGGDMRDNRSELYKYKV  
 VEIKPLGIAPTKCKRRVVERekRAVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLSGIV  
 QQSNLLRAPEAQQHMLQLTVWGIKQLQARVLAIERYLKDQQLGIWGCSGKLICCTA  
 VPWNSSWSNKSQEDIWDNMTWMQWDREISNYTDTIYRLLEESQNQQEKNEKDLLALD  
 SWNNLWNWFDITNWLWYIKIFIMIVGGLIGLRIIFAVLSIVNRVRQGYSPFSFQTLTPNPR  
 GPDRLGRIEEEGEQDRDRSIRLVSGFLALAWDDLRSCLFSYHRLRDFILIAARAVELL  
 GRSSLRGLQRGWEALKYLGSLVQYWGLELKKS AISLLDTIAIAVAEGTDRIIELIQRICRA  
 IRNIPRRIRQGFEAALL

#### ЛИТЕРАТУРНЫЕ ИСТОЧНИКИ

1. Sanders et al. J. Virol. (2002) 76(17), 8875-89
2. Sanders et al. Science (2015) 349(6224), 139-140
3. Julien et al. Proc. Nat. Acad. Sci. (2015) 112(38), 11947-52
4. de Taeye et al. Cell (2015) 163(7), 1702-15
5. Kwon et al. (2015) Nat. Struct. Mol. Biol. 22(7) 522-31
6. Eglen et al. Curr. Chem. Genomics, (2008) 25(1), 2-10
7. Kong et al, Nat Commun. 2016 Jun 28;7:12040. doi: 10.1038/ncomms12040
8. Julien et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (2015) 112(38) 11947-52
9. Barouch et al, Nat Med 2010, 16: 319-323
10. WO 2010/059732
11. European Patent Application EP15200138.4
12. Sharma SK, et al. Cell Rep. (2015) 11(4):539-50. doi: 10.1016/j.celrep.2015.03.047.

13. Georgiev IS, et al. *J Virol.* (2015) 89(10):5318-29. doi: 10.1128/JVI.03451-14.
14. López-Sagaseta J, et al (2016) *Computational and Struct Biotechnol J* 14: 58-68.
15. Zhao L, et al (2014) *Vaccine* 32: 327-337
16. He L, et al (2016) *Nat Commun.* 2016 Jun 28;7:12041. doi: 10.1038/ncomms12041
17. WO2011082087
18. Kesavardhana A and Varadarajan R (2014) *J Virol* 88: 9590-9604
19. Guenaga J, et al (2017) *Immunity* 46: 792-803
20. Bale S, et al (2017) *J. Virol.* doi:10.1128/JVI.00443-17
21. Abbink et al (2007) *Virol.* 81(9): 4654-64
22. Altschul SF et al (1997) *Nucleic Acid Res.* 25: 3389-3402
23. Harris et al (2011) *PNAS* 108 (28): 11440-11445
24. Kushnir et al (2012) *Vaccine* (31): 58-83
25. WO 2007/104792
26. WO 2014/124301
27. US 2016/0122392
28. Ingale J, et al. *Cell Rep.* (2016) 15: 1986-99.
29. Bak M, et al. *Bioconjug Chem.* (2016) 27: 1673-80.
30. Darrah PA, et al. *Nat Med.* (2007) 13: 843-50.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный белок оболочки (Env) вируса иммунодефицита человека (HIV), где аминокислота в положении 658 выбрана из группы, состоящей из Val, Ile, Phe, Met, Ala и Leu; где нумерация положений соответствует нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1.

2. Рекомбинантный белок Env HIV по п. 1, где аминокислота в положении 658 представляет собой Val.

3. Рекомбинантный белок Env HIV по п. 1, где аминокислота в положении 658 представляет собой Ile.

4. Рекомбинантный белок Env HIV по любому из пп. 1-3, дополнительно содержащий один или несколько из следующих аминокислотных остатков:

(i) Phe, Leu, Met или Trp, предпочтительно Phe, в положении 651;

(ii) Phe, Ile, Met или Trp, предпочтительно Ile, в положении 655;

(iii) Asn или Gln, предпочтительно Asn, в положении 535;

(iv) Val, Ile или Ala в положении 589;

(v) Phe или Trp, предпочтительно Phe, в положении 573;

(vi) Ile в положении 204; и/или

(vii) Phe, Met или Ile, предпочтительно Phe, в положении 647;

где нумерация положений соответствует нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1.

5. Рекомбинантный белок Env HIV по п. 4, содержащий Val в положении 658 и Ile в положении 655.

6. Рекомбинантный белок Env HIV по п. 4 или п. 5, содержащий Val в положении 658 и Phe в положении 651.

7. Рекомбинантный белок Env HIV по любому из пп. 4-6, содержащий по меньшей мере два аминокислотных остатка из (i) - (vii).

8. Рекомбинантный белок Env HIV по любому из пп. 1-7, где белок Env HIV представляет собой белок Env HIV из клады A, B или C, предпочтительно белок Env HIV из клады C.

9. Рекомбинантный белок Env HIV по любому из пп. 1-8, где указанные аминокислоты присутствуют в исходном белке Env HIV, где исходный белок Env HIV выбран из:

(a) белка Env HIV, содержащего консенсусную последовательность Env HIV;

(b) синтетической последовательности Env HIV и

(c) белка Env HIV дикого типа, предпочтительно из клады C, содержащего по меньшей мере одну восстанавливающую мутацию, предпочтительно по меньшей мере 3 восстанавливающие мутации, по аминокислотному остатку, который присутствует в соответствующем положении с частотой, составляющей менее 7,5%, предпочтительно менее 2% последовательностей Env HIV в совокупности из 1000, предпочтительно по меньшей мере 10000 последовательностей Env HIV дикого типа, где восстанавливающая

мутация представляет собой замену на аминокислотный остаток, который присутствует в соответствующем положении с частотой, составляющей по меньшей мере 10% последовательностей Env HIV в указанной совокупности, и предпочтительно восстанавливающая мутация представляет собой замену на аминокислотный остаток, который наиболее часто присутствует в соответствующем положении в указанной совокупности.

10. Рекомбинантный белок Env HIV по любому из пп. 1-9, дополнительно содержащий Cys в положениях 501 и 605 или Pro в положении 559, предпочтительно Cys в положениях 501 и 605 и Pro в положении 559.

11. Рекомбинантный белок Env HIV по любому из пп. 1-10, дополнительно предусматривающий одно или несколько из следующего:

(viii) Gln, Glu, Ile, Met, Val, Trp или Phe, предпочтительно Gln или Glu, в положении 588;

(ix) Lys в положении 64, или Arg в положении 66, или Lys в положении 64 и Arg в положении 66;

(x) Trp в положении 316;

(xi) Cys в обоих из положений 201 и 433;

(xii) Pro в положении 556 или 558 или в обоих из положений 556 и 558;

(xiii) замещения петли в положениях аминокислот 548-568 (HR1-петля) петель, имеющей 7-10 аминокислот, предпочтительно петель из 8 аминокислот, например, имеющей последовательность, выбранную из любой из (SEQ ID NO: 12-17);

(xiv) Gly в положении 568, или Gly в положении 569, или Gly в положении 636, или Gly в обоих из положений 568 и 636, или Gly в обоих из положений 569 и 636; и/или

(xv) Tug в положении 302, или Arg в положении 519, или Arg в положении 520, или Tug в положении 302 и Arg в положении 519, или Tug в положении 302 и Arg в положении 520, или Tug в положении 302 и Arg в обоих из положений 519 и 520.

12. Рекомбинантный белок Env HIV по любому из пп. 1-11, дополнительно содержащий мутацию в последовательности расщепления фурином белка Env HIV, предпочтительно замещение в положениях 508-511 на RRRRRR (SEQ ID NO: 10).

13. Рекомбинантный белок Env HIV по любому из пп. 1-12, который представляет собой белок gp140 или gp160.

14. Тримерный комплекс, содержащий нековалентно связанный олигомер из трех идентичных рекомбинантных белков Env HIV по любому из пп. 1-13.

15. Частица, предпочтительно липосома или наночастица, представляющая на своей поверхности рекомбинантный белок Env HIV по любому из пп. 1-13 или тримерный комплекс по п. 14.

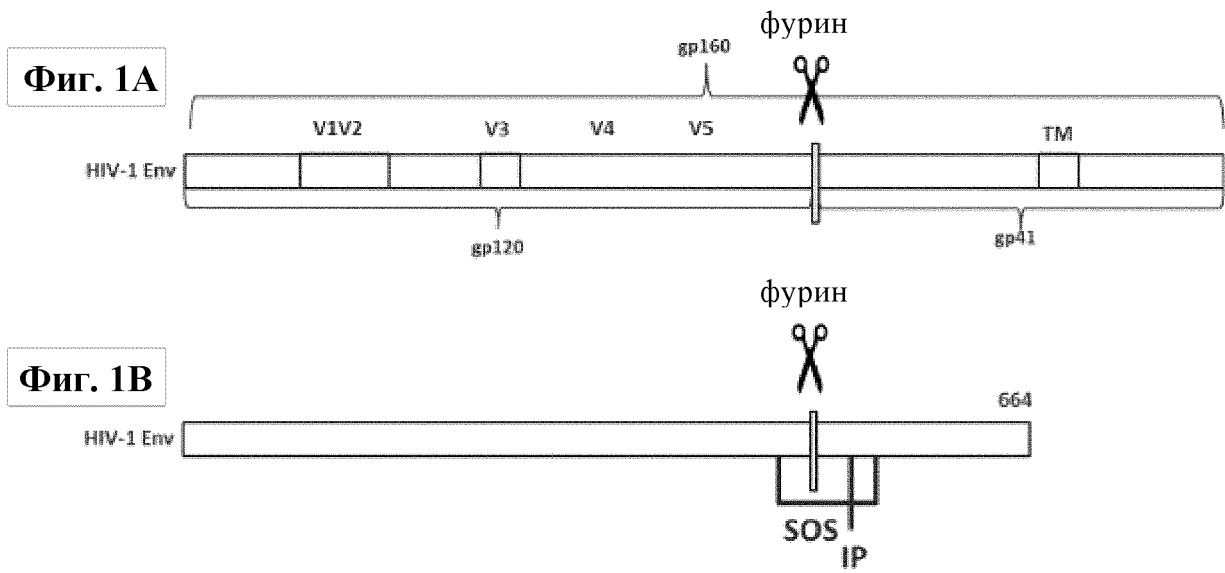
16. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный белок Env HIV по любому из пп. 1-13.

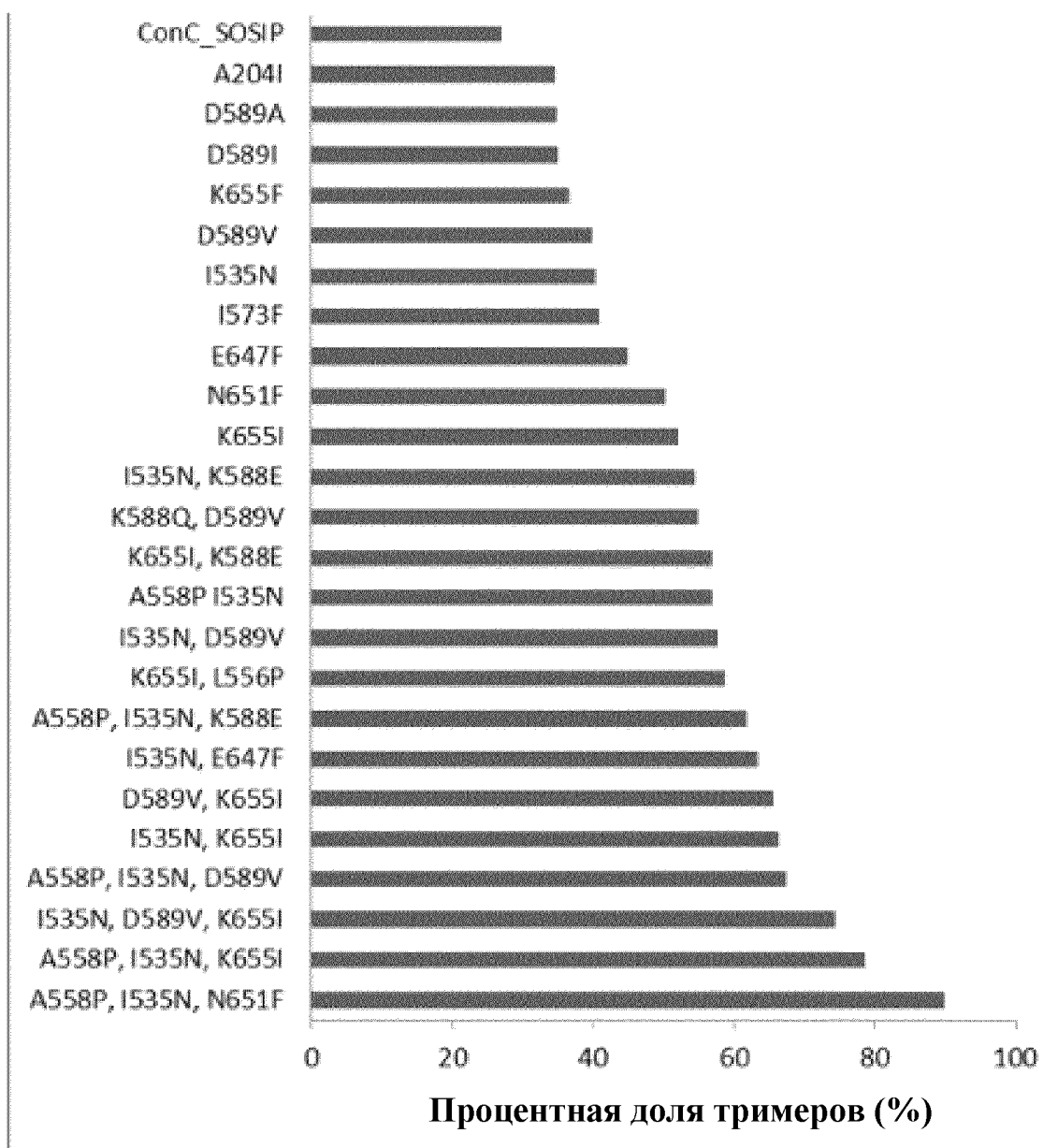
17. Вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 16, функционально связанную с промотором.

18. Вектор по п. 17, который представляет собой аденовирусный вектор.
19. Клетка-хозяин, содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 16 или вектор по п. 17 или п. 18.
20. Способ получения рекомбинантного белка Env HIV, предусматривающий выращивание клетки-хозяина по п. 19 в условиях, подходящих для получения рекомбинантного белка Env HIV.
21. Композиция, содержащая рекомбинантный белок Env HIV по любому из пп. 1-13, тримерный комплекс по п. 14, частицу по п. 15, выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 16 или вектор по п. 17 или п. 18 и фармацевтически приемлемый носитель.
22. Способ улучшения образования тримеров белка Env HIV, при этом способ предусматривает введение замены Lys или Gln в положении 658 на Val, Ile, Phe, Met, Ala или Leu, наиболее предпочтительно на Val или Ile, предпочтительно на Val, в исходном белке Env HIV, где нумерация положений соответствует нумерации в gp160 из изолята HXB2 HIV-1.

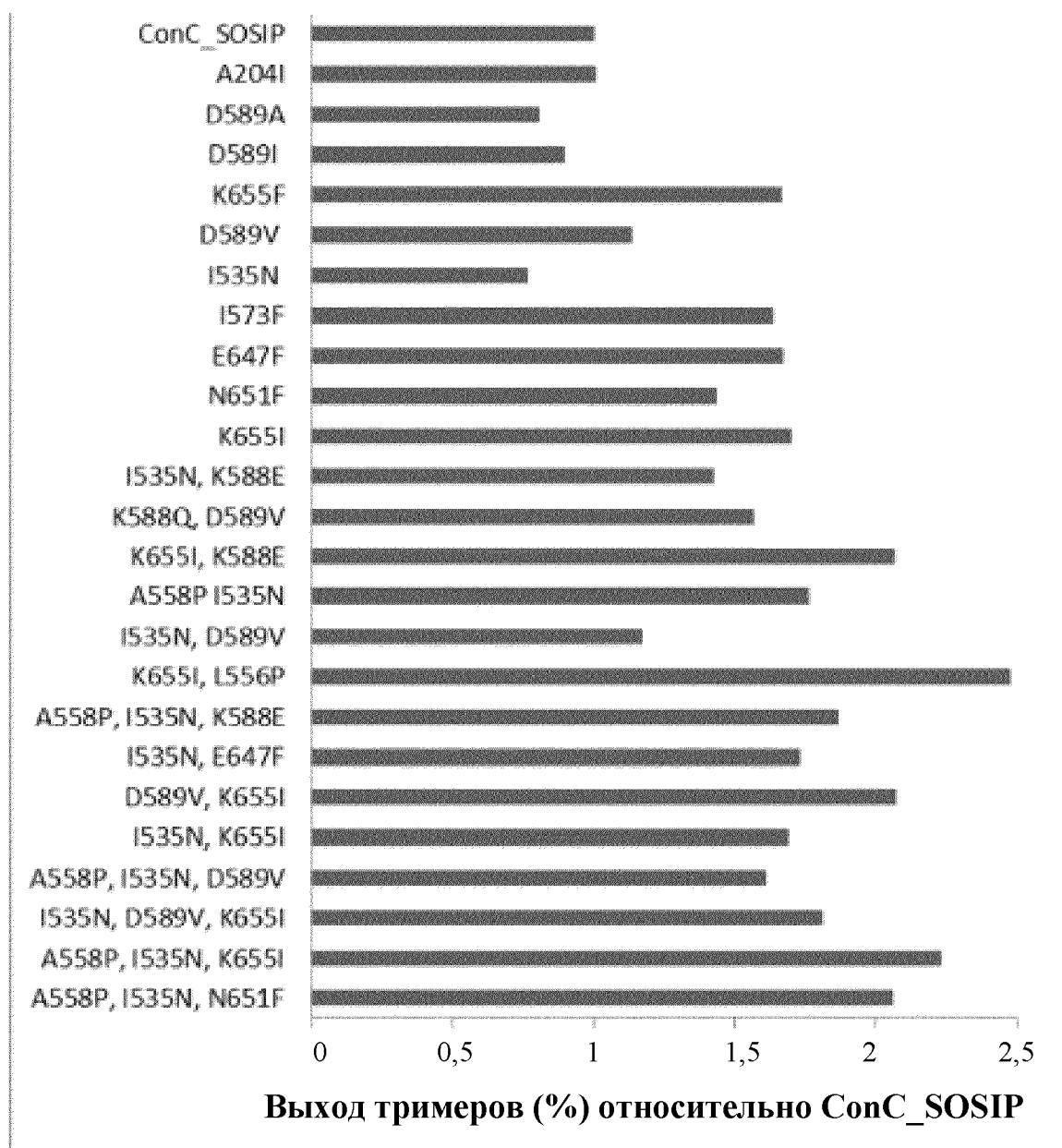
По доверенности

Фиг. 1





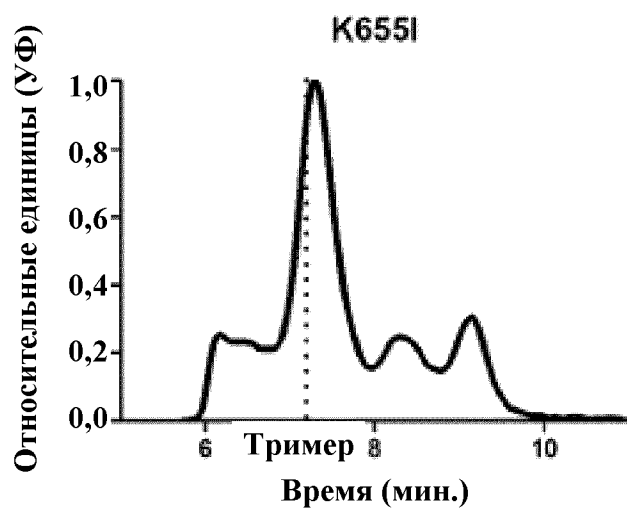
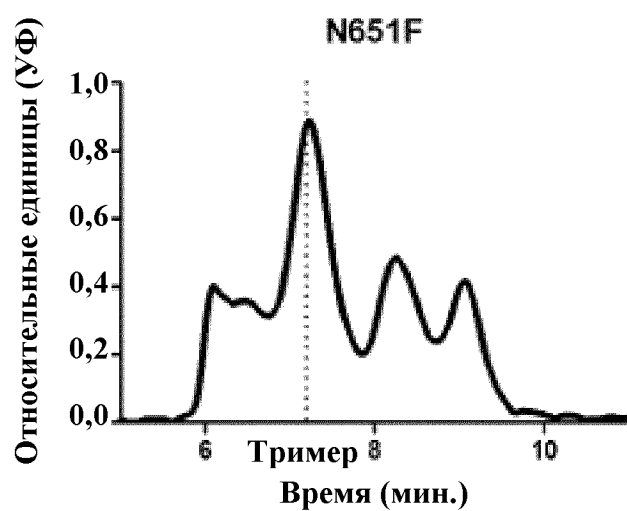
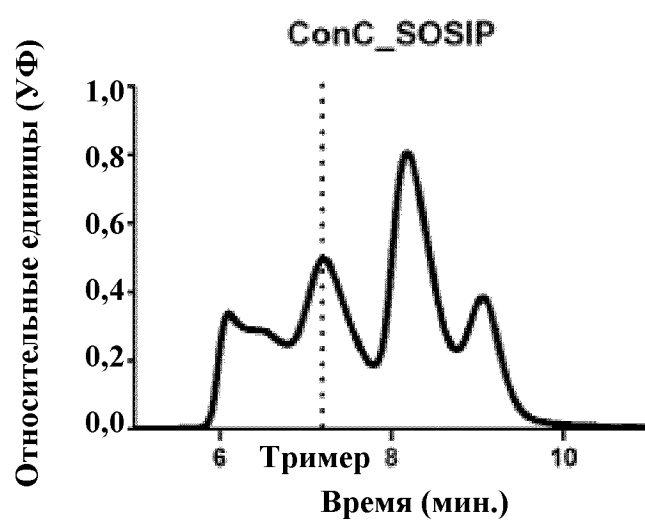
Фиг. 2А



Фиг. 2В

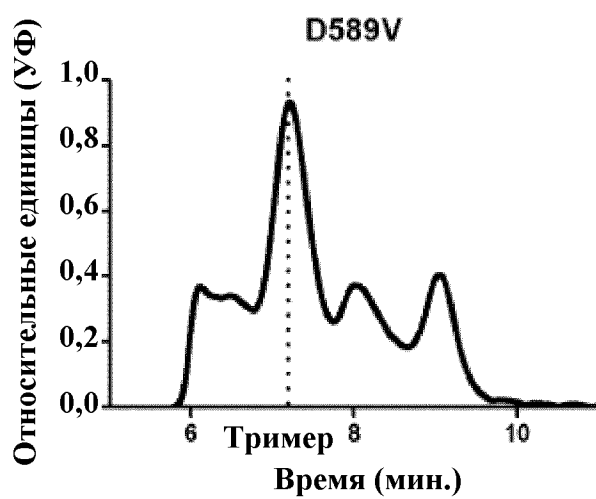
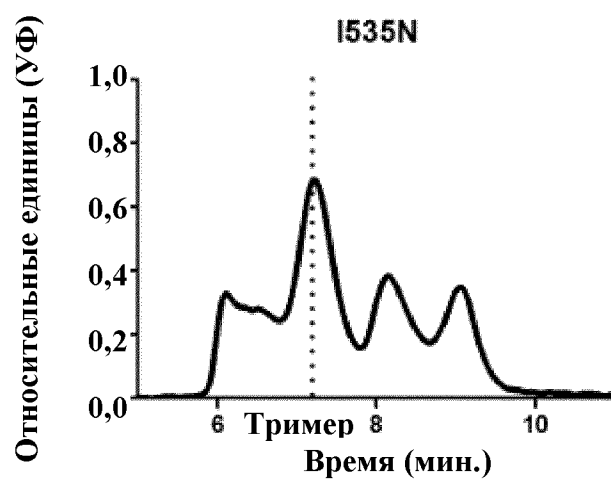


4/25



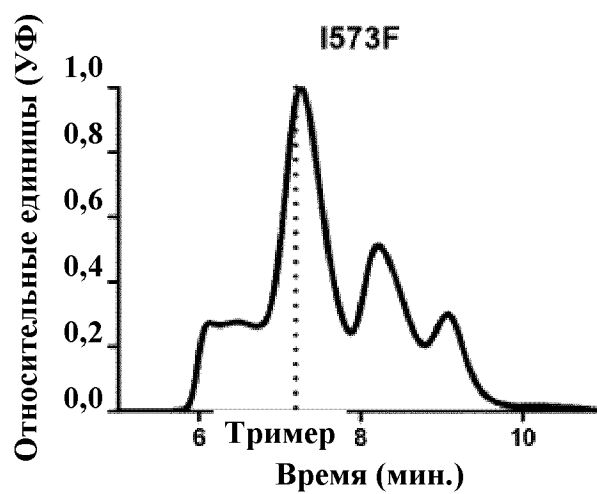
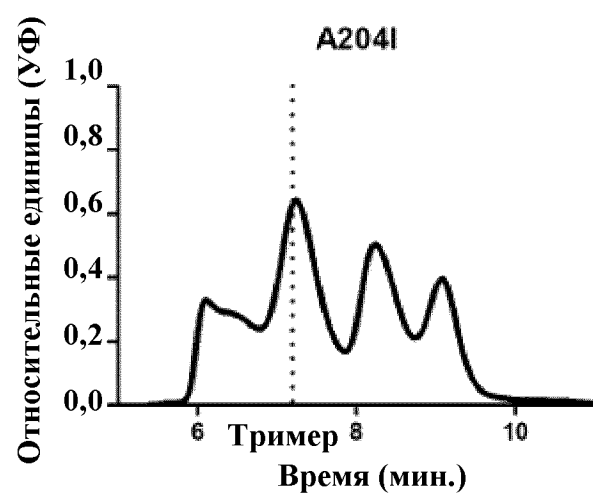
Фиг. 3

5/25



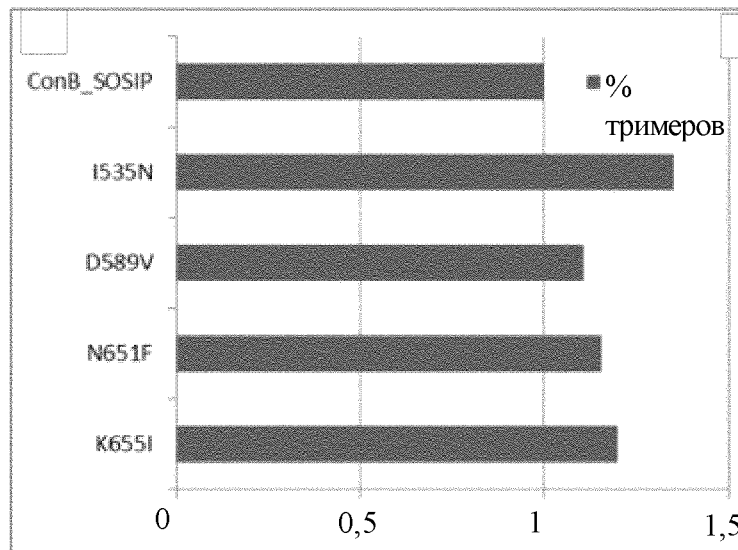
Фиг. 3, продолжение

6/25

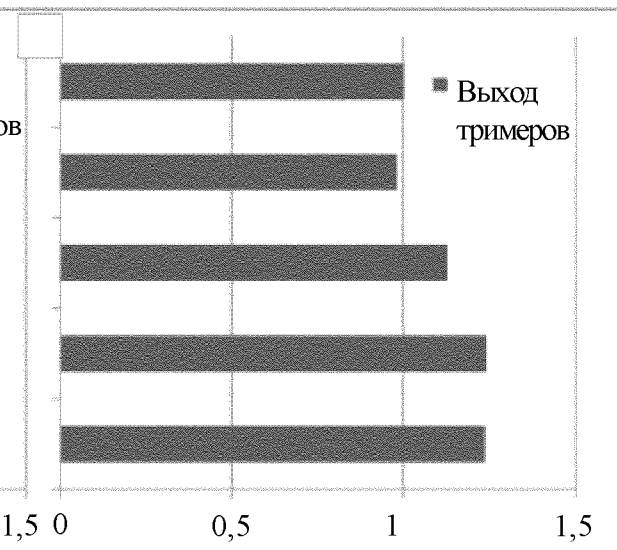


Фиг. 3, продолжение

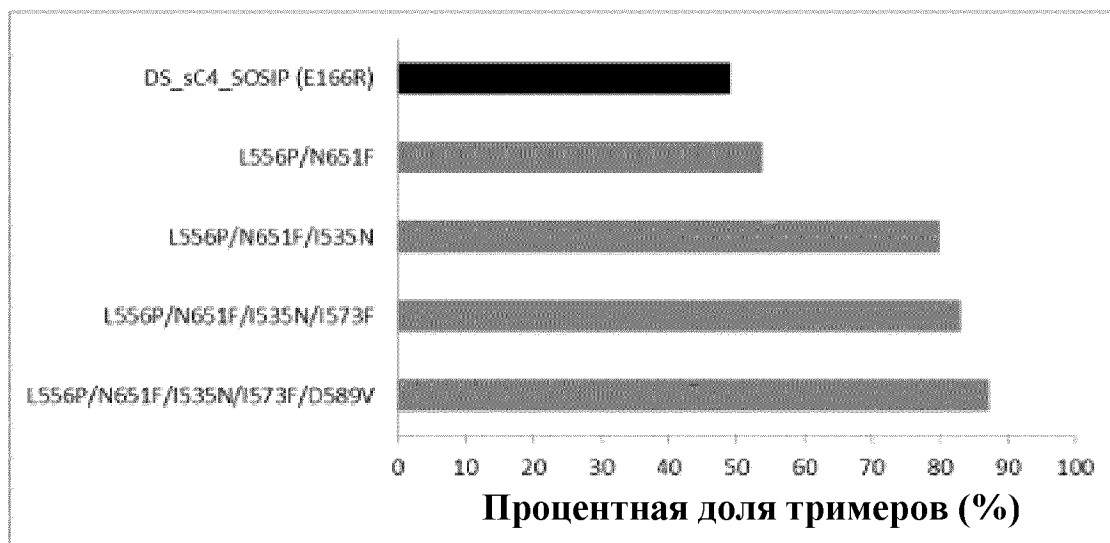
Фиг. 4А



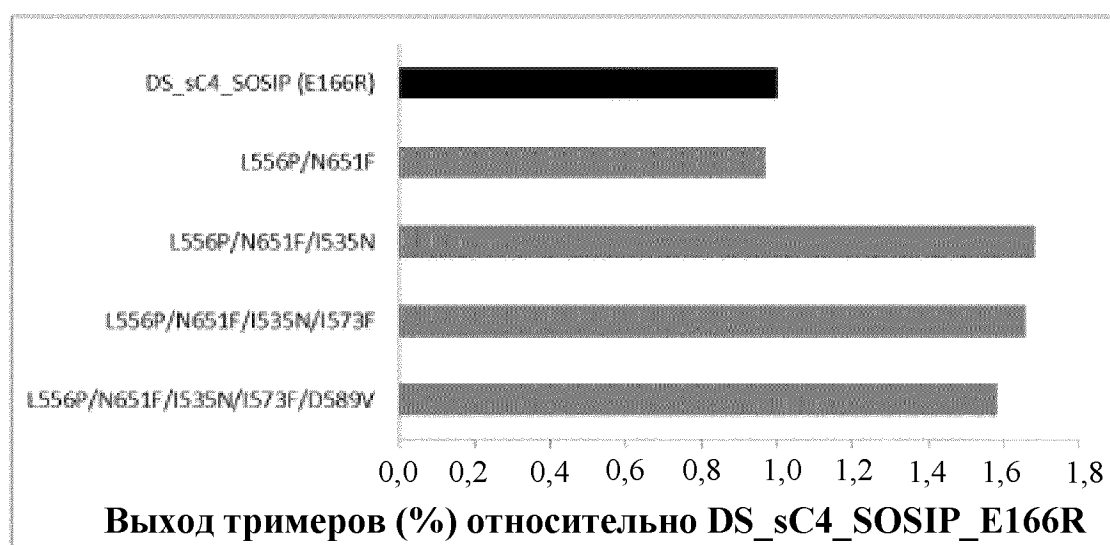
Фиг. 4В

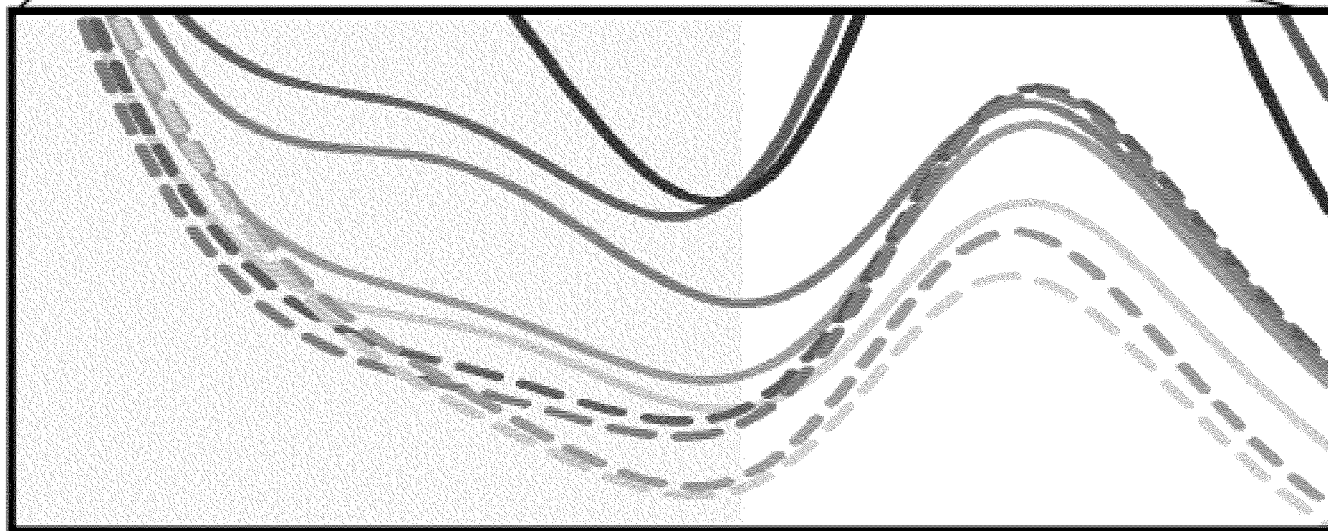
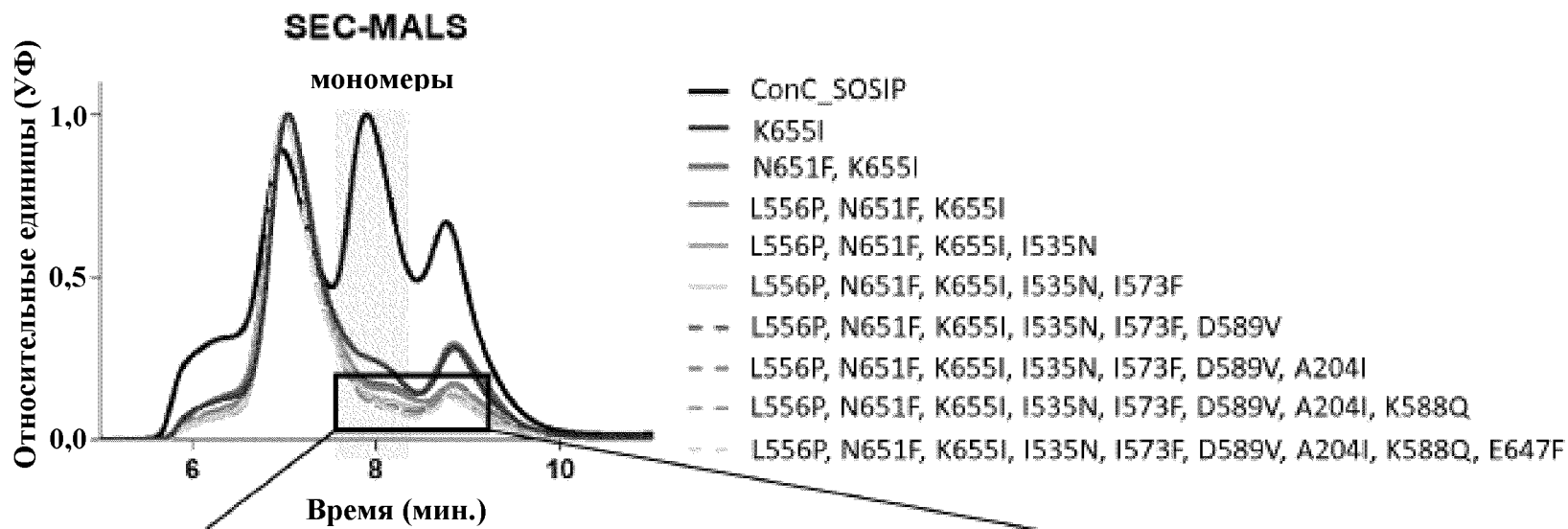


Фиг. 5А



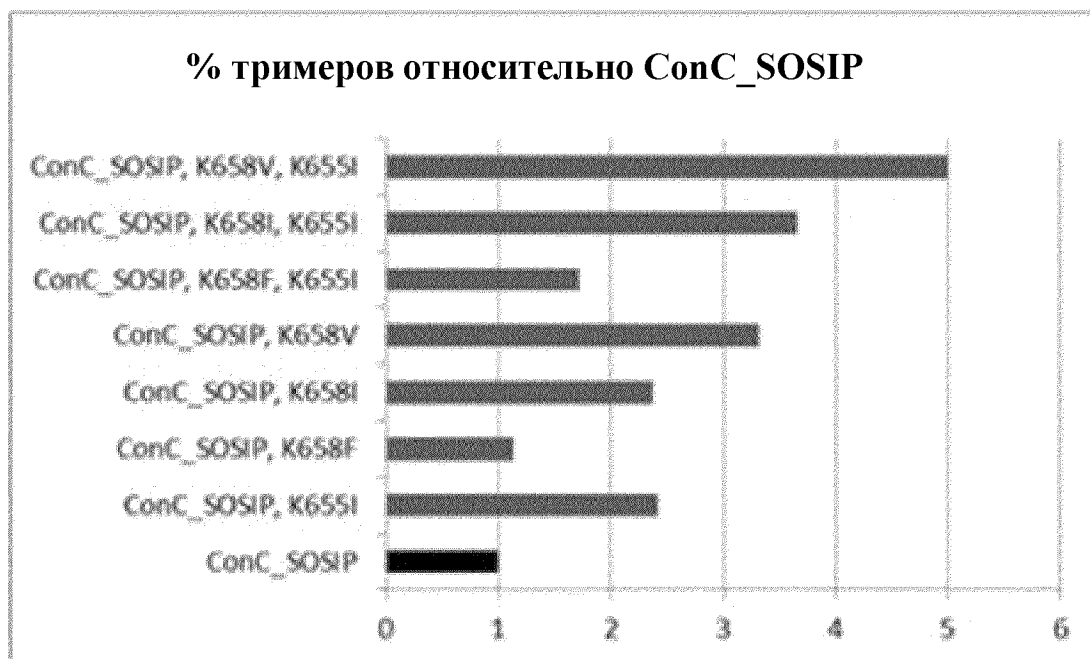
Фиг. 5В



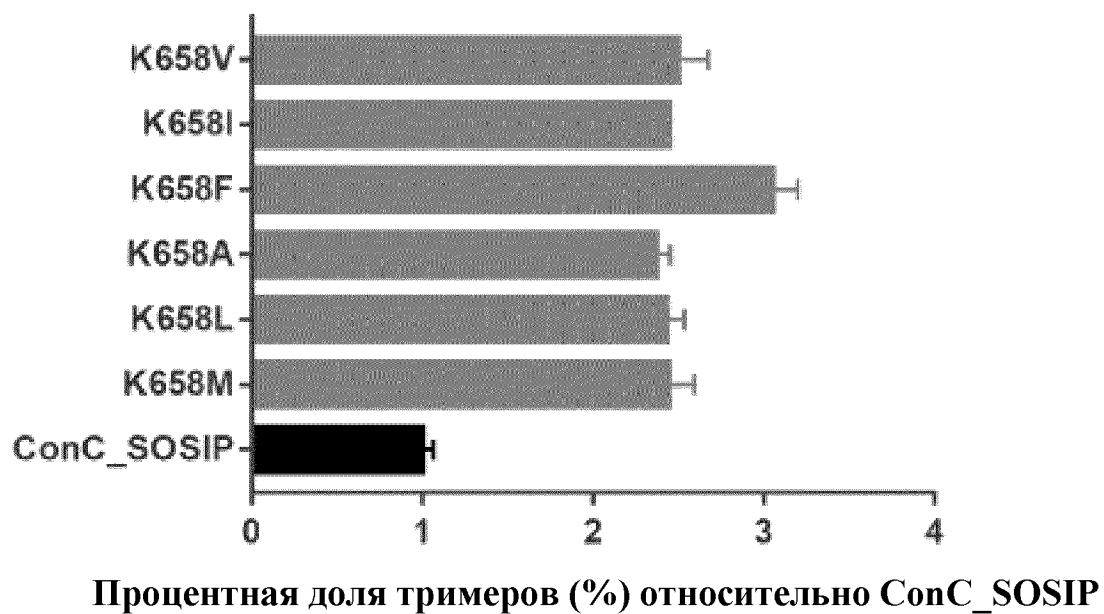


Фиг. 6

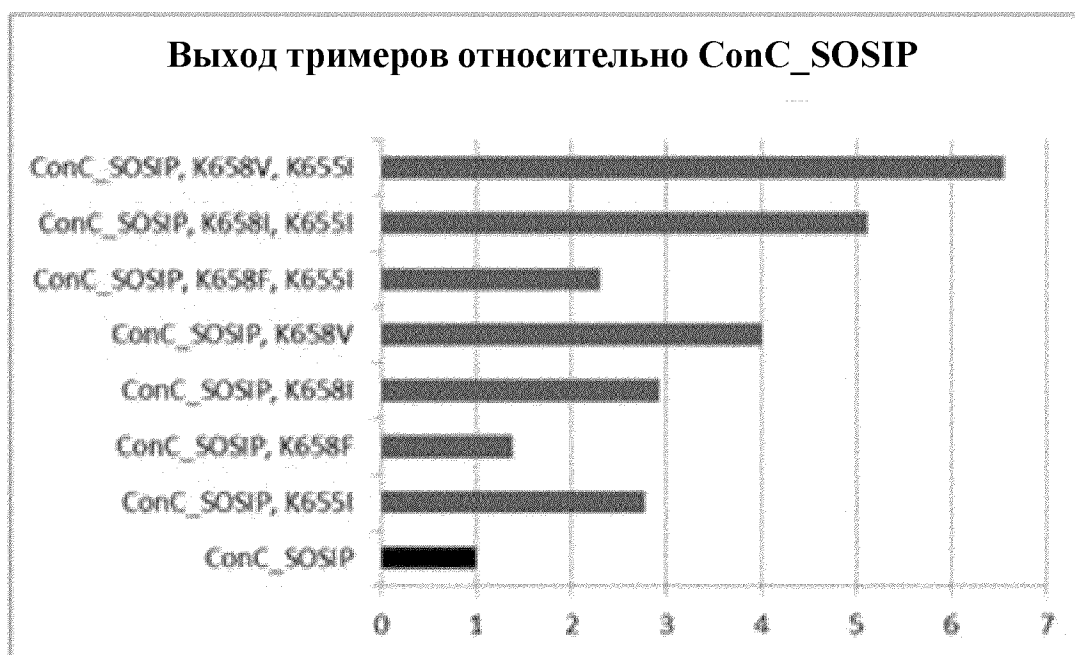
Фиг. 7А



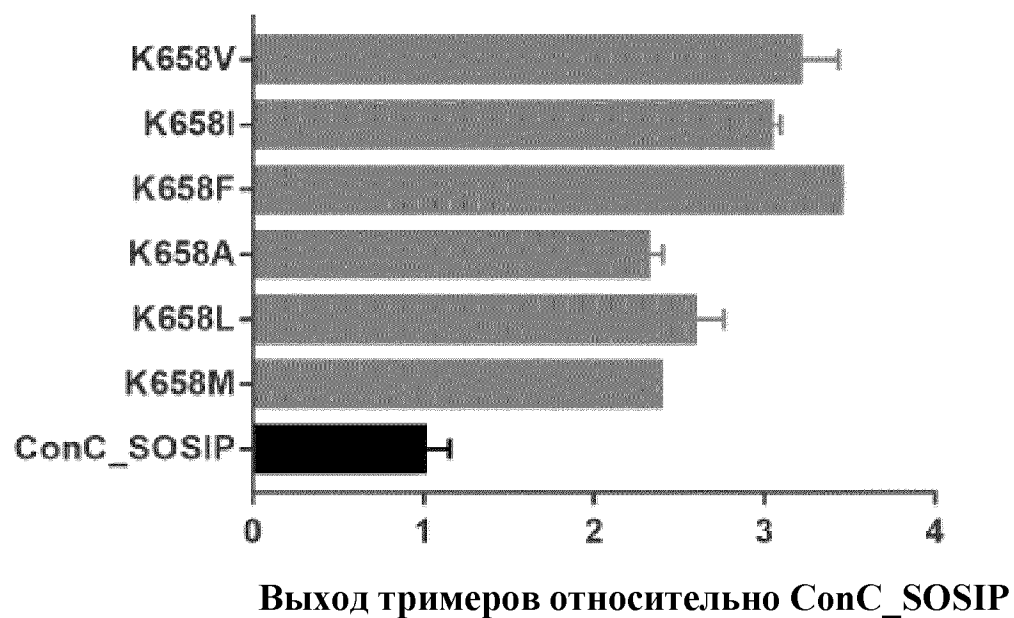
Фиг. 7В



Фиг. 7С

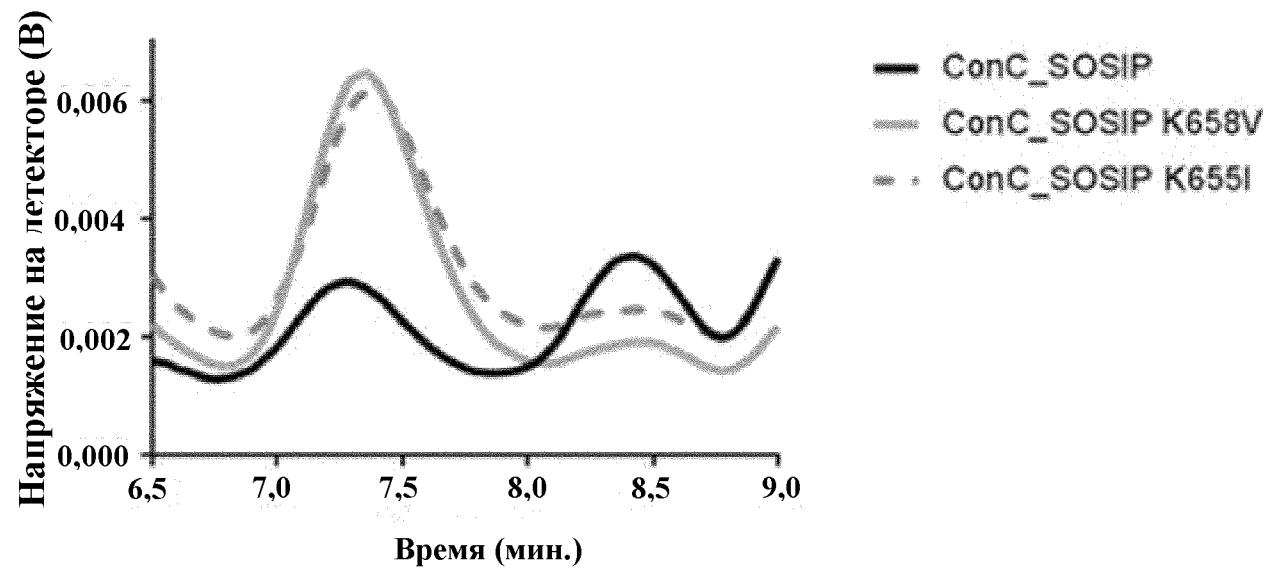


Фиг. 7D

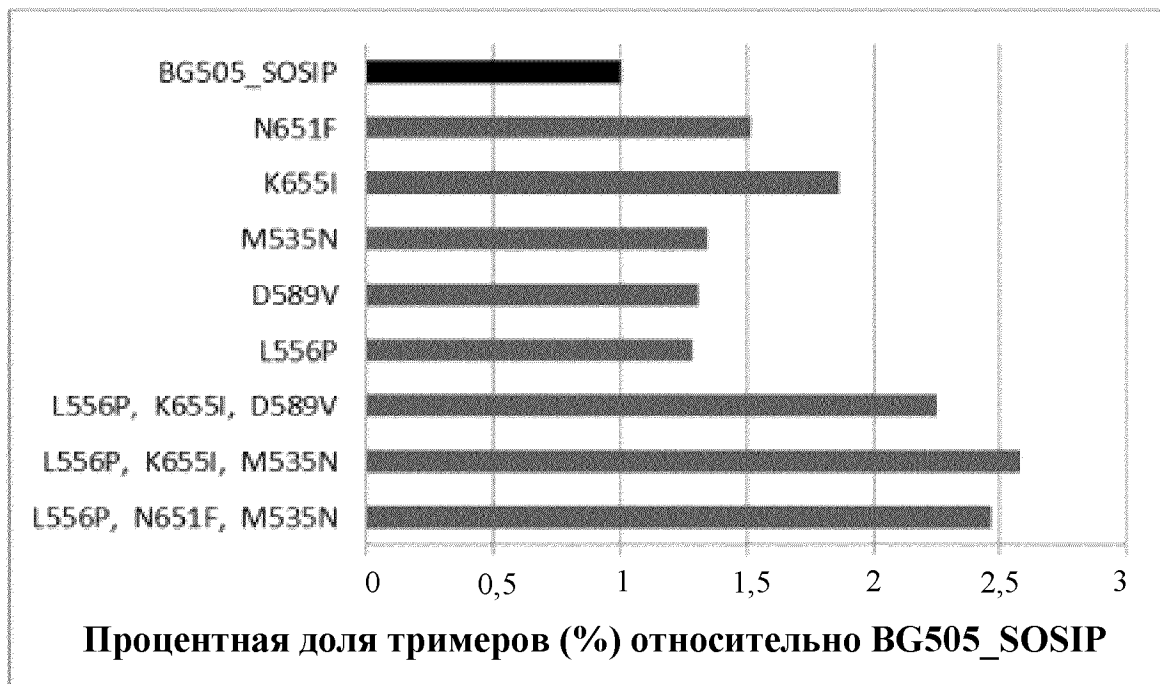




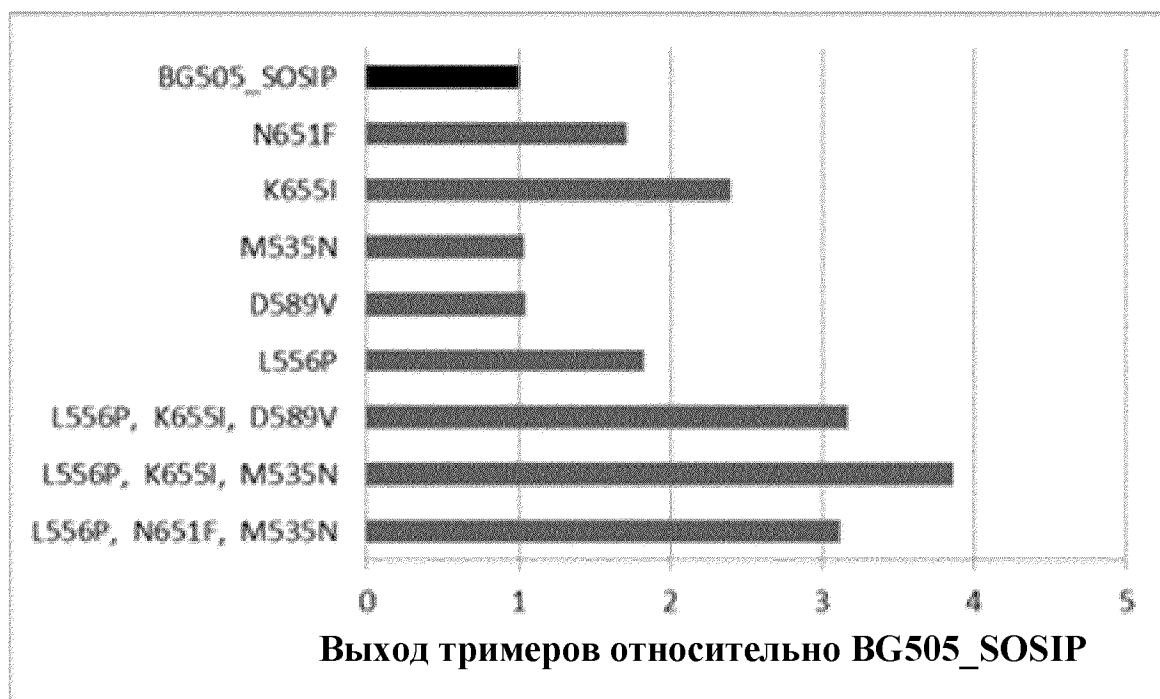
Фиг. 8



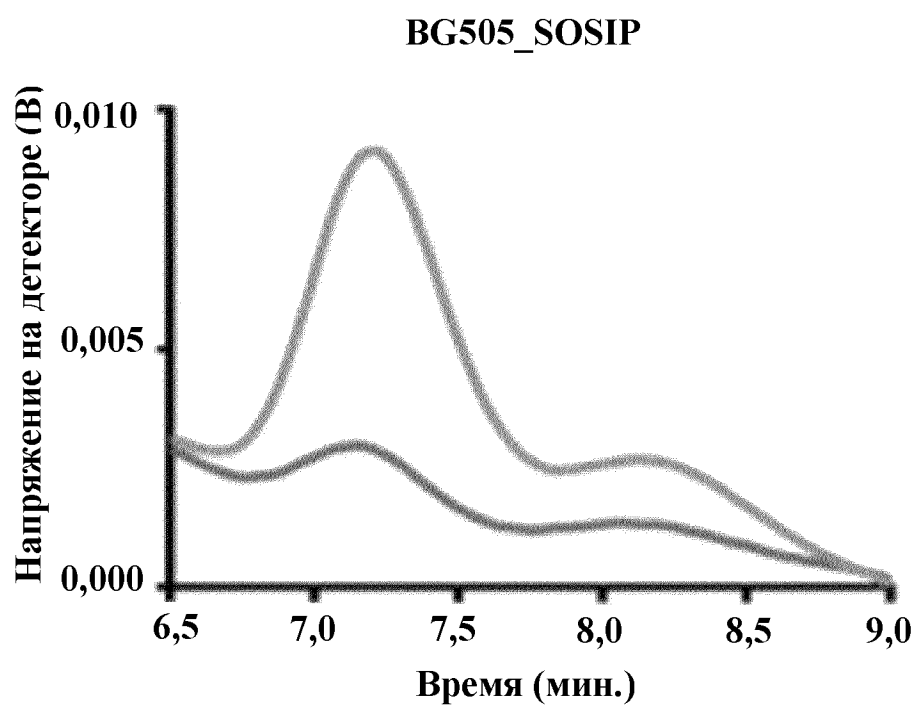
Фиг. 9А



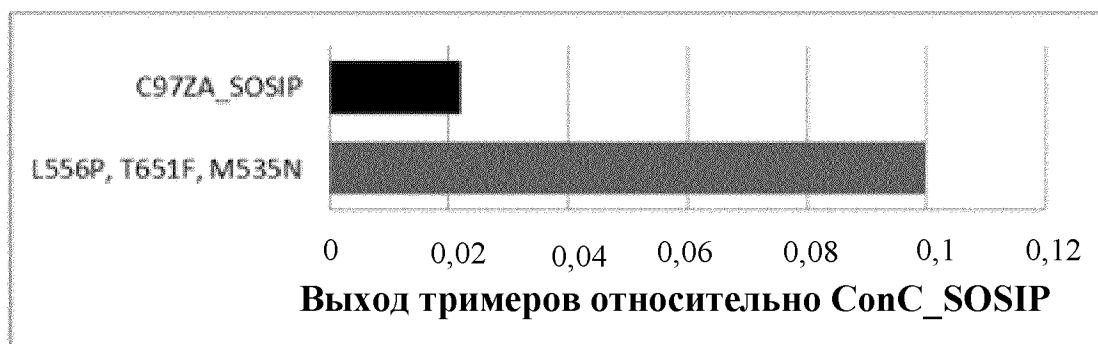
Фиг. 9В

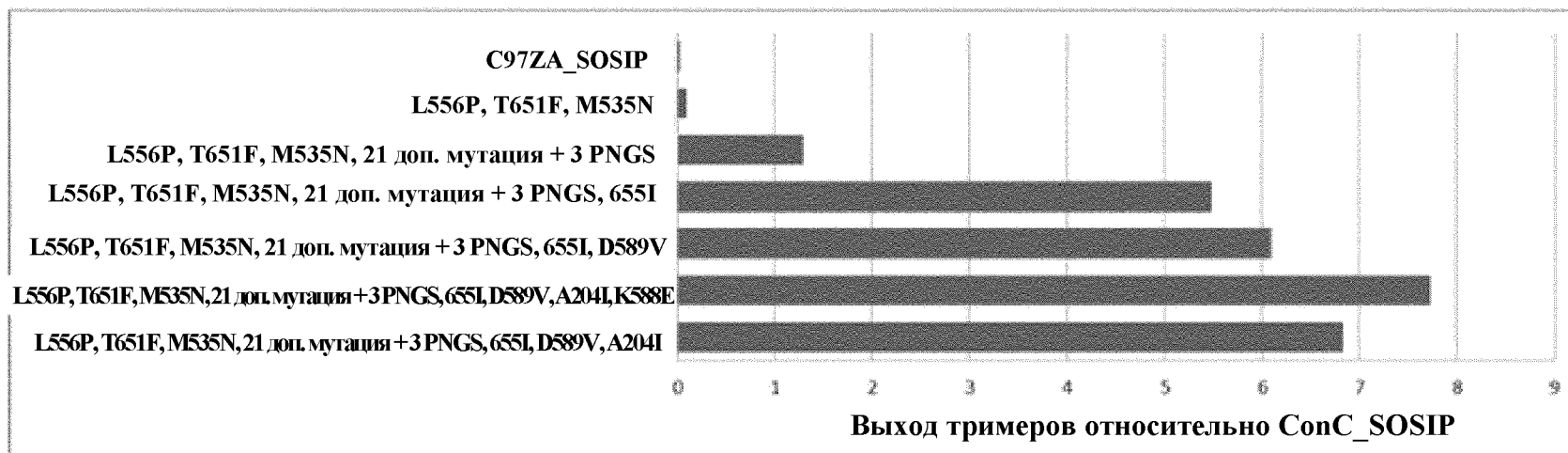


Фиг. 10

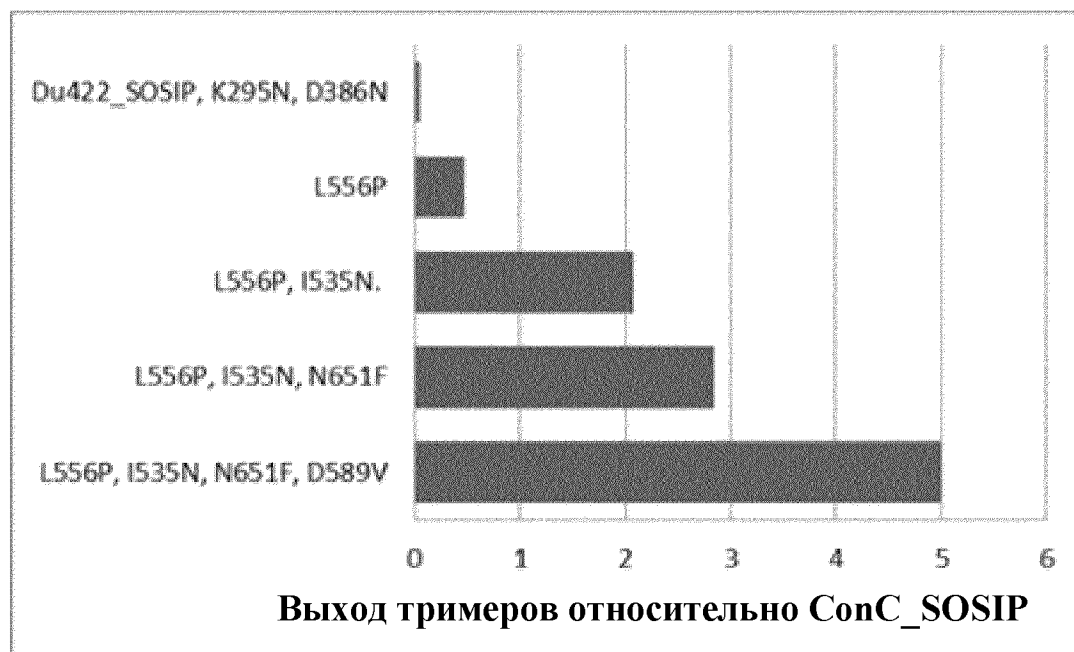


Фиг. 11А

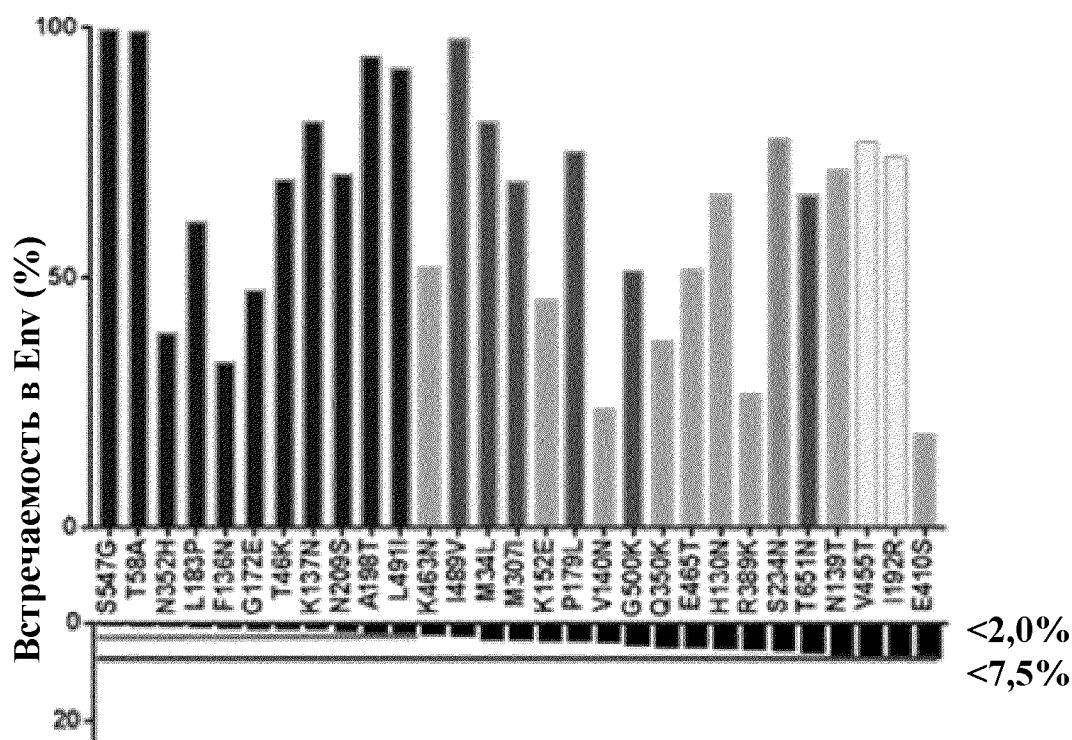




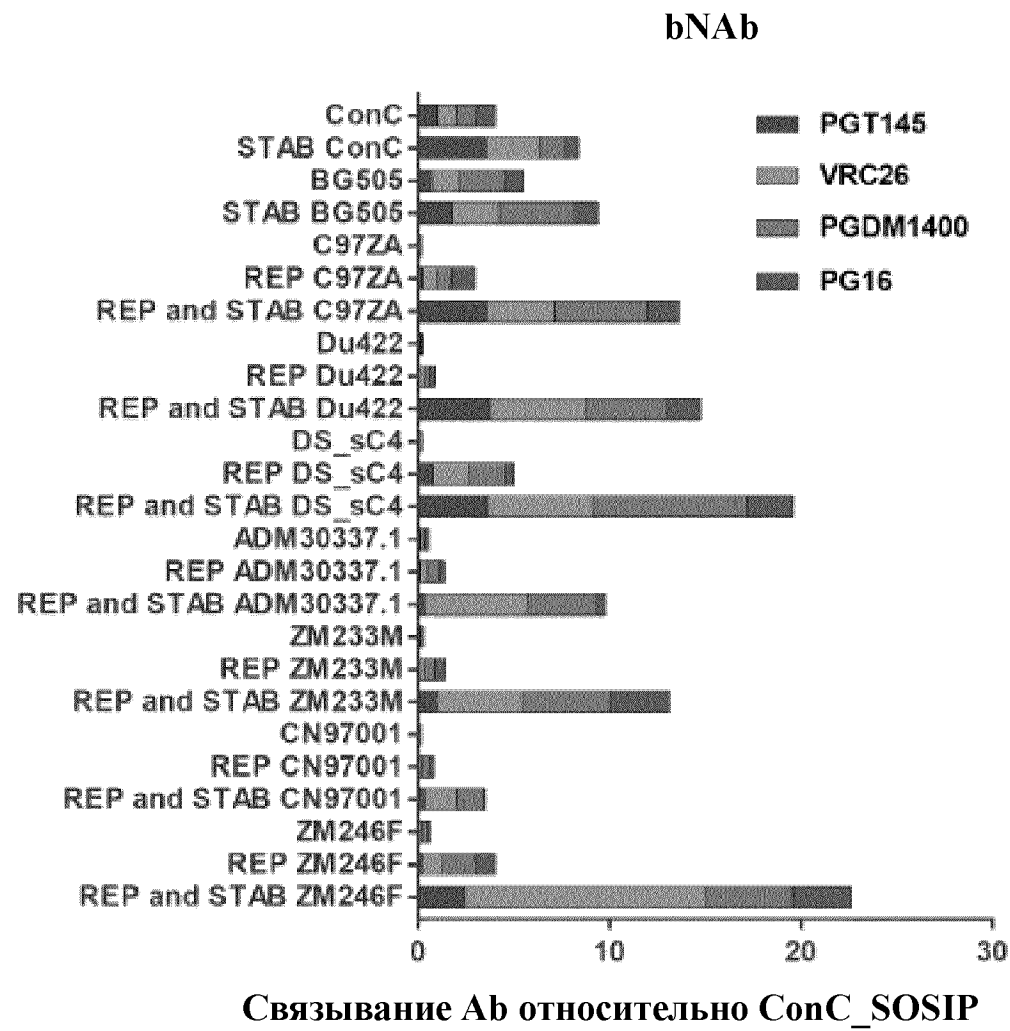
Фиг. 12



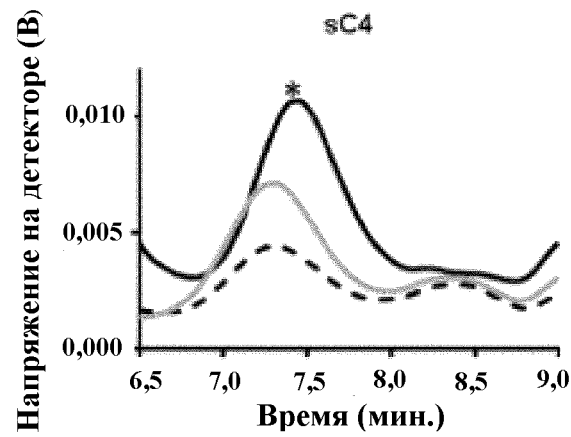
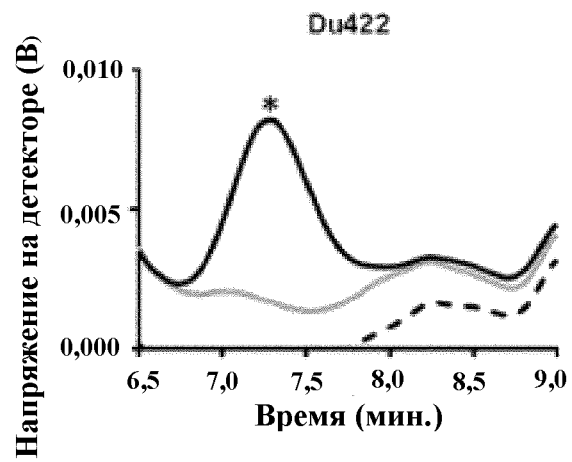
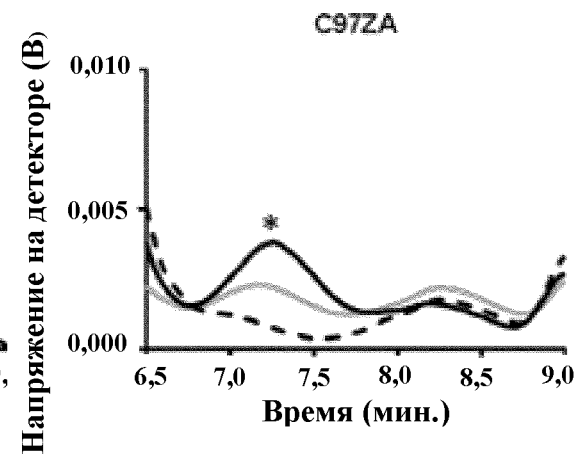
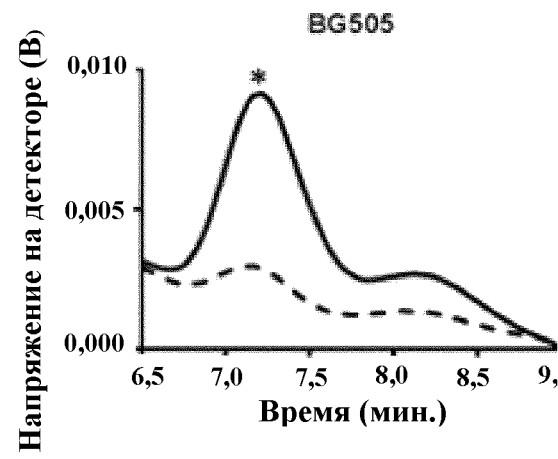
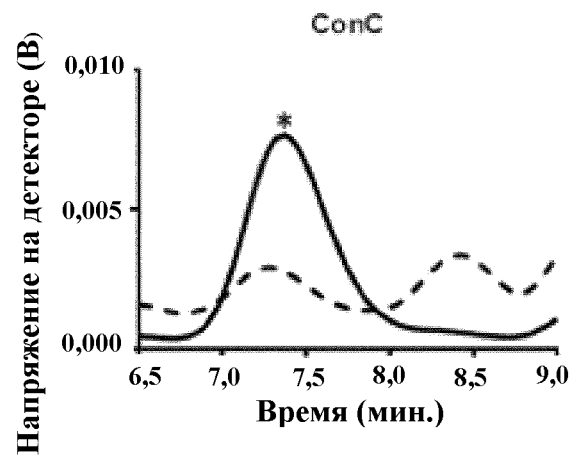
Фиг. 13



Фиг. 14







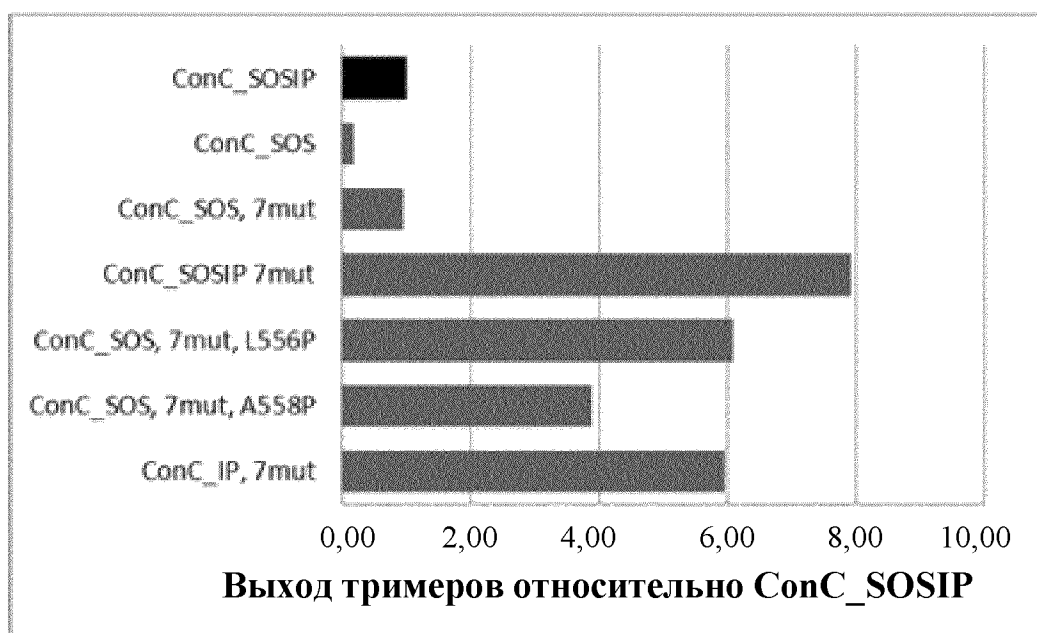
--- Каркас SOSIP

..... Восстановленный

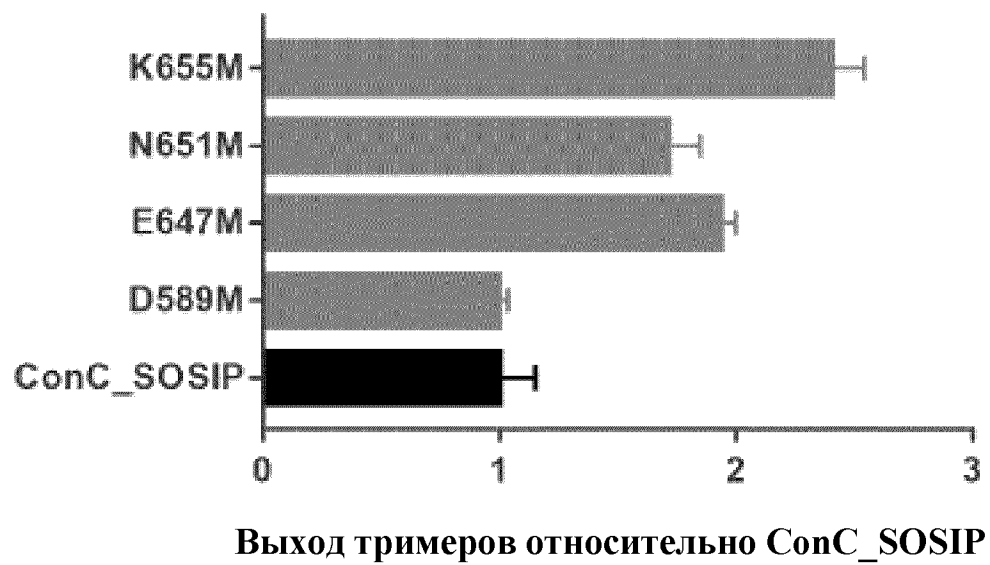
— Восстановленный и стабилизированный

Фиг. 15

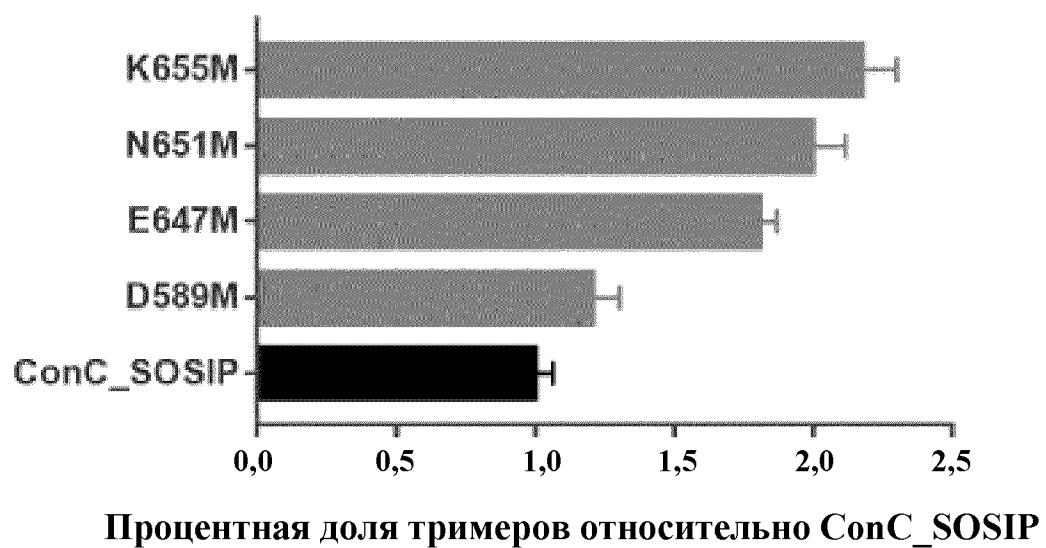
Фиг. 16



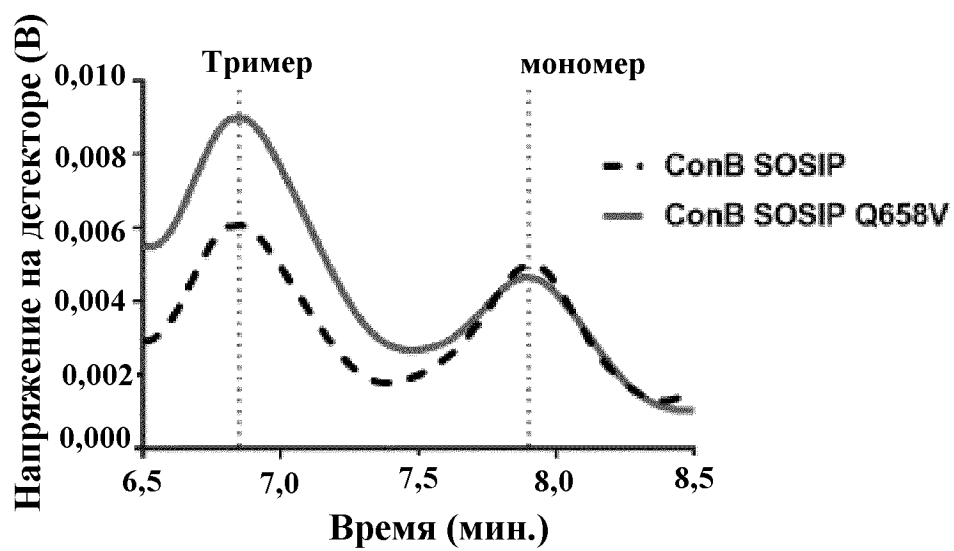
Фиг. 17А



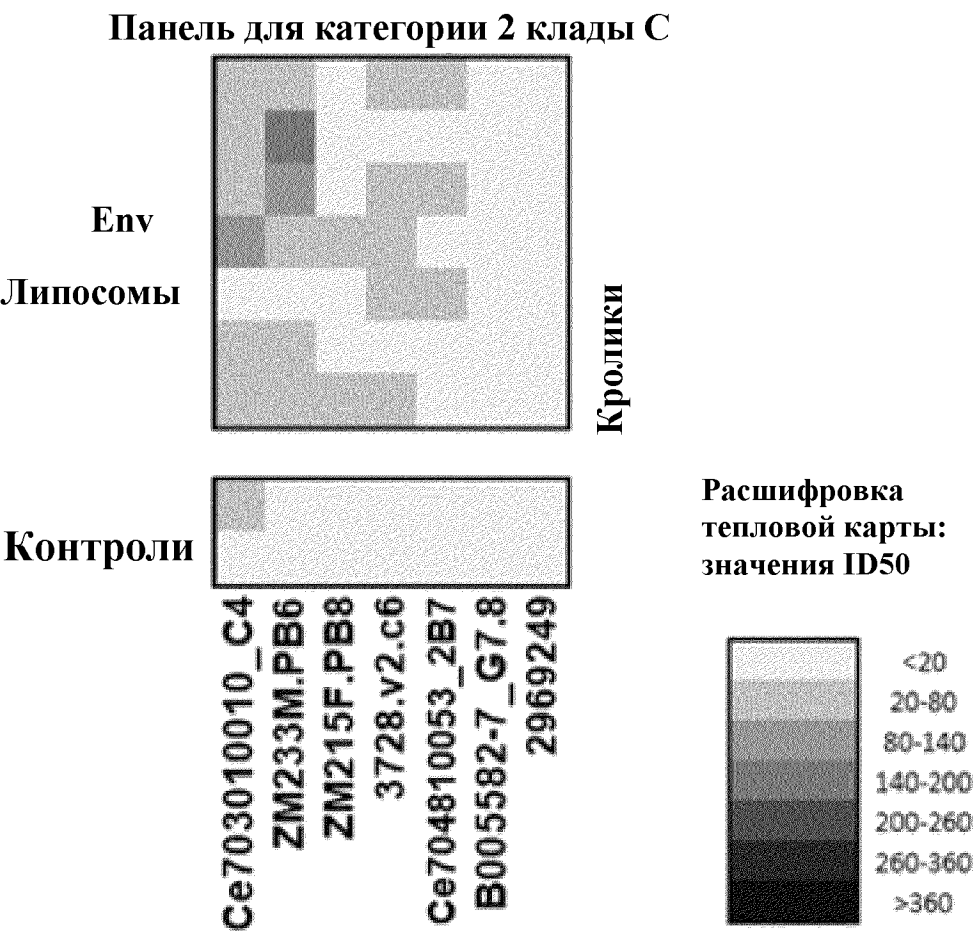
Фиг. 17В



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20

