

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037583**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.04.16**

(21) Номер заявки  
**201790717**

(22) Дата подачи заявки  
**2015.09.24**

(51) Int. Cl. *A61K 39/21* (2006.01)  
*A61K 39/12* (2006.01)  
*C12N 15/86* (2006.01)

---

(54) **СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ИНДУКЦИИ ЗАЩИТНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ ИНФЕКЦИИ ВИРУСОМ ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА**

---

(31) **62/056,059**

(32) **2014.09.26**

(33) **US**

(43) **2018.02.28**

(86) **PCT/US2015/051891**

(87) **WO 2016/049287 2016.03.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**БЕТ ИЗРЕЙЭЛ ДИКОНИСС  
МЕДИКАЛ СЕНТЕР, ИНК.  
(US); ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД  
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:  
**Бараух Дэн (US), Схейтемакер  
Йоханна, Пау Мария Грация, Ван  
Манен Даниелль (NL), Томака Фрэнк  
(US), Хендрикс Дженнифер Анн (NL)**

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

(56) "Potent, protective anti-HIV immune responses generated by bimodal HIV envelope DNA plus protein vaccination" by Letvin et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 94, pp. 9378-9383, August 1997; abstract, pg. 9379, col. 1, para 1, pg. 9380, col. 1 to col. 2  
WO-A1-2014107744

---

(57) Описаны композиции, вакцины и способы индукции защитного иммунитета против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Гетерологичные комбинированные вакцины, состоящие из одного или более вирусных экспрессирующих векторов и выделенного антигенного полипептида, индуцировали сильный защитный иммунитет против инфекций ВИЧ одного или множества субтипов.

---

**B1**

**037583**

**037583**

**B1**

### **Перекрестные ссылки на родственные заявки**

Эта заявка заявляет право на приоритет согласно 35 USC 119 (e) предварительной патентной заявки США № 62/056059, поданной 26 сентября 2014 г., раскрытие которой включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

### **Заявление относительно федерального финансирования исследований и разработок**

Это изобретение было осуществлено при поддержке Грантов № A1078526 и A1096040, полученных Национальным институтом здоровья. Правительство имеет определенные права на изобретение.

### **Ссылка на список последовательностей, поданный в электронном виде**

Данная заявка содержит список последовательностей, который представлен в электронном виде посредством EFS-Web в виде отформатированного в формате ASCII списка последовательностей с именем файла "688097-53WO список последовательностей", дата создания 15 сентября 2015 года и размер 47 Кб. Список последовательностей, представленный с помощью EFS-Web, является частью описания и включен в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

### **Область техники**

Изобретение относится к композициям, вакцинам и к способам индукции защитного иммунитета против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Конкретно, изобретение относится к гетерологичным комбинированным вакцинам, состоящим из одного или более вирусных экспрессирующих векторов и выделенного антигенного полипептида, для индукции защитного иммунитета против ВИЧ-инфекций одного или более субтипов.

### **Уровень техники**

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) затрагивает миллионы людей во всем мире, и профилактика ВИЧ-инфекции остается очень высоким приоритетом, даже в эпоху широкого распространения антиретровирусной терапии. В Соединенных Штатах по оценкам Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC) из всех ВИЧ-инфицированных жителей США примерно одна пятая не знает о своем статусе, и эта малая часть ответственна за перенос половины новых инфекций каждый год [2]. Во всем мире разрыв между своевременной диагностикой и лечением намного больше. В конце 2010 года, по оценкам было 34 миллиона людей, живущих с ВИЧ во всем мире, что на 17% выше по сравнению с 2001. Хотя большинство новых случаев ВИЧ-инфекции продолжают происходить в странах Африки к югу от Сахары, по оценкам CDC ежегодная заболеваемость ВИЧ-инфекциями с 2008-2011 годов в Соединенных Штатах остается стабильной на уровне около 15-16/100000, с выявлением более 40000 новых случаев инфицирования каждый год. Таким образом, первоочередная задача глобального здравоохранения заключается в том, чтобы найти безопасную и эффективную вакцину против ВИЧ, которая могла бы предотвратить ВИЧ-инфекцию или притупить ее первоначальное воздействие до диагностирования, включая как разрушение пула CD4 кишечника [3], так и высокий риск передачи инфекции [4].

Полностью эффективная вакцина, как ожидается, способна вызывать как мощные клеточные ответы, так и нейтрализующие антитела широкого спектра действия, способные нейтрализовать штаммы ВИЧ-1 разных субтипов.

Кроме того, в последнее время клинические исследования выявили, что не нейтрализующие Env-специфические антитела могут иметь некоторую защитную способность, которая связана с функцией субтип-специфичных антител [9]. Нейтрализующие антитела широкого спектра действия направлены против высококонсервативных областей в оболочке вируса. До недавнего времени большинство вакцин против ВИЧ использовали очищенные антигенные белки ВИЧ, такие как gp160, gp120 или gp120, представленные в растворимой форме. Большинство иммуногенов на основе оболочечных (Env) белков представляют собой мономерные молекулы оболочки, которые вызывают связывание антител, но не мощных нейтрализующих антител. Отчасти это происходит из-за того, что нейтрализующие антитела распознают третичные и четвертичные эпитопы на нативной, тримерной структуре вирусных белков оболочки. Кроме того, большинство мономерных иммуногенов на основе Env-белков не индуцируют клеточно-опосредованный ответ. Сообщалось, что стабилизированные тримеры Env ВИЧ-1 индуцировали нейтрализующую антисыворотку широкого спектра действия против ВИЧ-1 *in vivo*. См., например, US 2012/0045472.

Было доказано, что живые ослабленные вакцины являются высокоэффективными в организме человека и в организме нечеловекообразных приматов (НЧП) против некоторых вирусных заболеваний, такие как вакцина на основе живого ослабленного обезьяньего вируса иммунодефицита (SIV) для предотвращения инфекции SIV. К сожалению, из-за рисков, связанных с безопасностью, ассоциированных с живым ослабленным ВИЧ, такая стратегия не применима для человеческой вакцины против ВИЧ.

Для того чтобы вызывать одновременно мощные клеточные ответы и нейтрализующие антитела широкого спектра действия, использовали рекомбинантные векторы для экспрессии генов антигенных белков ВИЧ *in vivo* в качестве альтернативы живым ослабленным вирусным вакцинам. Использование неспособных к репликации рекомбинантных вирусных векторов было изучено для вакцин и других типов генной терапии. Конкретно, не способные к репликации рекомбинантные аденовирусные векторы, в частности, аденовирусные серотипы 2 и 5 (Ad2 и Ad5) были широко изучены для применений для доставки генов, включая вакцинацию. Хотя было показано, что такие неспособные к репликации вакцины на

основе вектора Ad5 вызывают защитные иммунные ответы в различных животных моделях, применимость рекомбинантных вакцин на основе вектора Ad5 для ВИЧ и других патогенов может быть ограничена высокой серопревалентностью Ad5-специфичных нейтрализующих антител (NAb) в человеческих популяциях [17]. Например, в сероэпидемиологическом исследовании 4381 объектов по всему миру было отмечено, что титры Ad5 NAb были почти универсальными с высоким титром в странах Африки к югу от Сахары, причем большинство индивидуумов демонстрировали титры Ad5 NAb > 200 [14].

Было проведено несколько испытаний эффективности вакцины против ВИЧ-1 с использованием вакцин на основе рекомбинантных вакцин на основе вектора Ad5. Эти исследования включают испытание эффективности вакцин HVTN 502/STEP (Merck Ad5), HVTN 503/Phambili (Merck Ad5) и HVTN 505 (NIN VRC ДНК/Ad5) ВИЧ-1. Тем не менее, все три из этих исследований эффективности вакцин против ВИЧ-1, которые использовали нереплицирующиеся вакцины Ad5 и ДНК/Ad5, продемонстрировали отсутствие эффективности против инфекции ВИЧ-1. Кроме того, наблюдали тенденцию к увеличению ВИЧ-1-инфекции у объектов, вакцинированных Merck Ad5 вакциной из исследования STEP, по сравнению с плацебо. Накопленные к настоящему времени данные с использованием неспособных к репликации векторов, таких как аденовирусы подтипа 5 для вакцины против ВИЧ, вызывают разочарование благодаря неспособности продемонстрировать пользу в некоторых испытаниях на эффективность [5-8].

Проблемы, касающиеся безопасности векторов Ad5, в частности из исследования STEP [8, 10], привели к исследованию по существу биологически различных векторов Ad из альтернативных серотипов в качестве вирусных вакцинных векторов [11-13]. Одним из примеров альтернативного аденовирусного серотипа для Ad5 является аденовирус серотипа 26 (Ad26). Ad26 является сравнительно редким вирусом в организме человека, и неизвестно, чтобы он реплицировался в любых других видах. Рядом исследований аденовируса в различных популяциях было показано, что он очень редко выделяется, и даже когда выделяется, то редко ассоциирован с симптомами. Экспериментальная иммунизация аналогичным образом продемонстрировала мало доказательств для серьезной инфекции. См., например, ссылки [14] и [27]-[43]. Таким образом, нет никаких доказательств наблюдательных исследований, что Ad26 вызывает клинические симптомы у здоровых взрослых людей, а также на основе экспериментальных данных исследования стимулирования Ad26 также предположили, что энтеральная инфекция Ad26 не вызывает симптомов [44]. Дефектные по репликации аденовирусные векторы gAd26 могут наращиваться до высоких титров в Ad5 E1-комплементирующих клеточных линиях, подходящих для изготовления этих векторов в крупном масштабе и с клинической степенью чистоты [11], и было продемонстрировано, что этот вектор индуцирует гуморальный и клеточно-опосредованный иммунный ответ при применении вакцинной стратегии прайм-буст [11, 21]. Другой альтернативой является gAd35, дефектный по репликации аденовирусный вектор, полученный из аденовируса серотипа 35. Векторы gAd35 наращивают до высоких титров на клеточных линиях, подходящих для производства вакцин клинического класса [61], и были разработаны для препаратов в виде инъекций, а также стабильного ингаляционного порошка [62].

Эти альтернативные аденовирусные векторы демонстрируют эффективную трансдукцию человеческих дендритных клеток [63, 22] и, таким образом, обладают способностью опосредовать доставку и презентацию антигена на высоком уровне.

С точки зрения, по меньшей мере, использования рецепторов, тропизма *in vivo*, взаимодействия с дендритными клетками, врожденных иммунных профилей, адаптивных иммунных фенотипов и защитной эффективности против SIV у макак-резус было доказано, что Ad26 биологически очень отличается от Ad5 [11, 12, 15, 19-22]. Кроме того, была продемонстрирована безопасность и иммуногенность нереплицирующегося вектора Ad26 у человека (Clinical. Trials. Gov. NCT01215149). Кроме того, многие из предпочтительных биологических различий между Ad5 и Ad26, таких как более низкая серопревалентность и низкий титр нейтрализующих антител у человека, также присутствуют между Ad5 и Ad35.

Модифицированный вирус коровьей оспы Анкара (MVA), дефектный по репликации штамм вируса коровьей оспы также был использован в качестве вирусного вектора для рекомбинантной экспрессии антигенных белков ВИЧ. См., например, US 20110159036, US 8197825 и т.д. MVA связан с вирусом коровьей оспы, членом рода ортопоксвирусов семейства Poxviridae. Известно, что поксвирусы являются хорошими индукторами CD8-T-клеточных ответов из-за их внутрицитоплазматической экспрессии. Однако, как правило, считается, что они неудовлетворительны при генерировании T-клеток, рестриктированных по CD4 MHC класса II. См., например, [64].

Одним из возможных недостатков неспособных к репликации вирусных векторов является то, что экспрессия гена-мишени, который необходимо доставить хозяину из вирусного вектора, может уменьшаться после введения вектора. Будучи не в состоянии реплицироваться или размножаться в хозяине, вирусный вектор не может производить какие-либо новые копии, которые впоследствии могут быть использованы для усиления экспрессии генов, требуя, таким образом, повторного введения вирусного вектора. Если тот же самый аденовирусный серотип повторно вводят хозяину, хозяин может генерировать нейтрализующие антитела к этому конкретному аденовирусному серотипу, что приводит к серотип-специфичному антиаденовирусному ответу. Такой серотип-специфический антиаденовирусный ответ может предотвратить эффективное повторное введение вирусного вектора, что делает его менее эффективным в качестве вакцины или средства генной доставки.

Соответственно, существует потребность в данной области в получении улучшенных вакцин, которые могут быть использованы для индукции защитного иммунитета против ВИЧ-инфекции. Такая вакцина предпочтительно должна быть простой для введения, долгодействующей и иметь минимальные побочные эффекты. Кроме того, предпочтительно она должна быть эффективной против широкого разнообразия циркулирующих типов передающейся ВИЧ-инфекции, включая и наиболее часто встречающиеся в разных регионах мира.

#### **Краткое описание сущности изобретения**

Изобретение частично основано на открытии того, что комбинации выделенного антигенного белка ВИЧ с экспрессирующими векторами, такими как неспособные к репликации вирусные векторы, кодирующие антигены ВИЧ, индуцируют повышенный защитный иммунитет против ВИЧ одного или более субтипов.

Соответственно, один общий аспект изобретения относится к комбинированной вакцине для индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у субъекта, нуждающегося в этом, содержащей

первую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество одного или более экспрессирующих векторов, кодирующих один или более антигенных полипептидов ВИЧ, и фармацевтически приемлемый носитель;

вторую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида и фармацевтически приемлемый носитель; и

иммуногенно эффективное количество одного или более дополнительных экспрессирующих векторов, кодирующих один или более дополнительных антигенных полипептидов,

где одна из первой и второй композиций предназначена для прайм-иммунизации, а другая композиция - для буст-иммунизации, и иммуногенно эффективное количество дополнительных экспрессирующих векторов присутствует во второй композиции или в третьей композиции для введения вместе со второй композицией для прайм- или буст-иммунизации.

В одном воплощении изобретения выделенный антигенный полипептид комбинированной вакцины содержит гликопротеин оболочки ВИЧ и предпочтительно стабилизированный тример gp140 ВИЧ. В конкретных воплощениях изобретения выделенный антигенный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В одном воплощении изобретения один или более экспрессирующих векторов и один или более дополнительных экспрессирующих векторов комбинированной вакцины представляют собой аденовирусные векторы, такие как гAd26, гAd35, гAd48, векторы гAd5HVR48 или векторы MVA. В конкретном воплощении изобретения один или более дополнительных экспрессирующих векторов присутствуют в третьей композиции комбинированной вакцины.

В конкретных воплощениях изобретения один или более антигенных полипептидов, кодируемых одним или более экспрессирующими векторами, и/или одним или более дополнительными экспрессирующими векторами, включают один или более мозаичных антигенов ВИЧ, более предпочтительно, один или более мозаичных антигенов Gag-Pol-Env ВИЧ, и более предпочтительно, содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4. В других конкретных воплощениях изобретения один или более экспрессирующих векторов представляют собой векторы гAd26, кодирующие один или более антигенных полипептидов ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4, и один или более дополнительных экспрессирующих векторов представляют собой векторы MVA, кодирующие один или более антигенных полипептидов ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4.

В предпочтительном воплощении изобретения комбинированная вакцина содержит первую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество векторов гAd26, кодирующих три антигенных полипептида ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, и SEQ ID NO: 4, соответственно, и фармацевтически приемлемый носитель; вторую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида, содержащего стабилизированный тример gp140 ВИЧ, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и фармацевтически приемлемый носитель; и третью композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество векторов MVA, кодирующих четыре антигенных полипептида ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

Еще один общий аспект изобретения относится к комбинированной вакцине согласно воплощению изобретения для применения в генерировании защитного иммунного ответа против инфекции вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), где первая композиция используется для прайминга иммунного ответа, и вторая композиция и иммуногенно эффективное количество одного или более дополнительных экспрессирующих векторов используются для бустинга иммунного ответа.

Другой общий аспект изобретения относится к набору, содержащему комбинированную вакцину согласно воплощению изобретения.

Еще один общий аспект изобретения относится к способу индукции иммунного ответа против ви-

руса иммунодефицита человека (ВИЧ) у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает:

(i) введение объекту первой композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество одного или более экспрессирующих векторов, кодирующих один или более антигенных полипептидов ВИЧ, и фармацевтически приемлемый носитель;

(ii) введение объекту второй композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида и фармацевтически приемлемый носитель; и

(iii) введение объекту иммуногенно эффективного количества одного или более дополнительных экспрессирующих векторов, кодирующих один или более дополнительных антигенных полипептидов ВИЧ,

где стадии (i) и (ii) осуществляют в любом порядке, причем одна из стадий предназначена для прайм-иммунизации, а другая - для буст-иммунизации, и иммуногенно эффективное количество одного или более дополнительных экспрессирующих векторов присутствует во второй композиции или в третьей композиции, вводимой вместе со второй композицией для прайм- или буст-иммунизации.

В одном воплощении изобретения первая композиция предназначена для прайм-иммунизации, а вторая композиция и иммуногенно эффективное количество одного или более дополнительных экспрессирующих векторов для буст-иммунизации.

В другом воплощении изобретения один или более дополнительных экспрессирующих векторов присутствуют в третьей композиции.

Еще один общий аспект изобретения относится к способу индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает:

(i) введение объекту прайм-вакцины, содержащей иммуногенно эффективное количество одного или более экспрессирующих векторов, кодирующих один или более антигенных полипептидов ВИЧ и фармацевтически приемлемый носитель; и

(ii) введение объекту буст-вакцины, содержащей иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида, иммуногенно эффективное количество одного или более дополнительных экспрессирующих векторов, кодирующих один или более дополнительных антигенных полипептидов ВИЧ и фармацевтически приемлемый носитель,

где выделенный антигенный полипептид и один или более дополнительных экспрессирующих векторов присутствуют в одной композиции или в отдельных композициях; и где буст-вакцину вводят после того, как вводят прайм-вакцину.

В предпочтительном воплощении изобретения одну или обе из прайм-вакцины и буст-вакцины повторно вводят один или более раз, чтобы дополнительно индуцировать иммунный ответ, где прайм-вакцину повторно вводят после ее первоначального введения, но до первого введения буст-вакцины.

В предпочтительном воплощении изобретения выделенный антигенный белок представляет собой гликопротеин оболочки ВИЧ, более предпочтительно, стабилизированный гликопротеина оболочки ВИЧ, такой как стабилизированный тримерный белок gp140 ВИЧ или стабилизированный мозаичный тримерный белок gp140, и еще более предпочтительно, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В другом предпочтительном воплощении изобретения один или более экспрессирующих векторов и/или один или более дополнительных экспрессирующих векторов кодируют один или более мозаичных антигенов ВИЧ, более предпочтительно, один или более мозаичных антигенов Gag-Pol-Env ВИЧ, и еще более предпочтительно кодируют один или более мозаичных антигенов Gag-Pol-Env ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4.

В еще одном предпочтительном воплощении изобретения один или более экспрессирующих векторов или дополнительных экспрессирующих векторов представляют собой аденовирусные векторы, такие как rAd26, rAd35, rAd48, векторы rAd5HVR48 или векторы MVA. Более предпочтительно, один или более векторов, используемых в качестве прайм-иммунизации, получают из другого типа вируса, в отличие от тех, которые используют для буст-иммунизации. Например, когда аденовирусные векторы, такие как rAd26 или векторы rAd35, используют для прайм-иммунизации, векторы MVA используют вместе с выделенным антигенным белком ВИЧ для буст-иммунизации.

В одном воплощении изобретения один или более экспрессирующих векторов представляют собой векторы rAd26, и один или более дополнительных экспрессирующих векторов представляют собой векторы MVA. В другом воплощении один или более экспрессирующих векторов представляют собой векторы MVA, и один или более дополнительных экспрессирующих векторов представляют собой векторы rAd26. Еще в одном воплощении один или более экспрессирующих векторов представляют собой векторы rAd26, и один или более дополнительных экспрессирующих векторов также представляют собой векторы rAd26.

В одном конкретном воплощении изобретения композиция, используемая для прайм-иммунизации, содержит векторы rAd26, кодирующие один или более антигенных белков, содержащих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 3 и 4 соответственно; и одна или более композиций, используемых для буст-иммунизации, содержат выделенный белок, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, и векторы MVA, кодирующие один или более антигенных белков,

имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-4 соответственно. Наиболее предпочтительно, векторы MVA присутствуют в третьей композиции.

#### **Краткое описание чертежей**

Предшествующее краткое описание сущности изобретения, а также следующее подробное описание изобретения будут лучше поняты при прочтении совместно с прилагаемыми чертежами. Следует понимать, что изобретение не ограничено точными воплощениями, представленными на чертежах.

На чертежах

на фиг. 1А и 1В показаны результаты иммуноферментного анализа (ИФА) белка оболочки (Env) gp140 субтипа С и мозаичного белка оболочки (Env) на образцах сыворотки, взятых у макаки-резус (*Macaca mulatta*) (НЧП), вакцинированных различными комбинированными вакцинами на 28 и 56 неделе после первоначального введения прайм-вакцины; представлены титры  $\log_{10}$ -трансформированных ЕС<sub>90</sub> ИФА, символы представляют титры индивидуальных тестируемых животных; горизонтальные линии обозначают среднее геометрическое титра группы, и пунктирные линии представляют собой более низкие пределы обнаружения; фиг. 1А: ИФА-титры gp140 Env субтипа С и мозаичного Env на 28-й неделе; фиг. 1В: ИФА-титры gp140 Env субтипа С и мозаичного Env на 56-й неделе;

на фиг. 2 - результаты антитело-зависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) на антителах иммуноглобулин G (IgG), очищенных из образцов сыворотки, полученных на 28-й неделе от вакцинированных НЧП с использованием антигена биотинилированного Env субтипа С и мозаичного Env; показана балльная оценка фагоцитарного ответа индивидуальных животных; символы представляют значения балльной оценки индивидуальных тестируемых животных, и серые столбцы указывают среднее геометрическое титра группы;

на фиг. 3 - результаты анализа нейтрализующего антитела (nAb) на образцах сыворотки, полученных на 56-й неделе из вакцинированных НЧП в клетках TZM-b1 против псевдовирюсов уровня 1 Env ВИЧ-1; тестируемые псевдовирюсы уровня 1 Env ВИЧ-1 включали MW965.26 (субтип С), SF162.LS (субтип В), MN-3 (субтип А), DJ263.8 (субтип А) и BaL.26 (субтип В); символы обозначают  $\log_{10}$ -трансформированные ID<sub>50</sub> (медианная инфекционная доза) титры от индивидуальных животных со средним геометрическим титра группы, указанным в виде горизонтальных линий; и

на фиг. 4 - результаты анализа IFN- $\gamma$  иммуноферментных пятен (ELISPOT) на образцах, полученных на 54-й неделе из вакцинированных НЧП с использованием глобального пула пептидов потенциальных Т-клеточных эпитопов (PTE); результаты представлены как средние пятнообразующие единицы (СОЕ) на 10<sup>6</sup> мононуклеаров периферической крови (PBMC); символы представляют значения для индивидуальных животных; горизонтальные линии указывают средние геометрические значения групп, и пунктирная линия представляет собой нижний порог обнаружения.

#### **Подробное описание изобретения**

Различные публикации, статьи и патенты приведены или описаны в уровне техники и по всему описанию; каждая из этих ссылок включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий или тому подобное, которые были включены в настоящее описание, предназначено для целей обеспечения контекста изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что любой или все эти вопросы являются частью предшествующего уровня техники в отношении любых изобретений, раскрытых или заявленных.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается обычным специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. В противном случае, некоторые термины, используемые в настоящем документе, имеют значения, указанные в спецификации. Все патенты, опубликованные патентные заявки и публикации, цитируемые в настоящем документе, включены в качестве ссылки, как если бы были полностью представлены в настоящем документе.

Следует отметить, что используемые в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в ряду. Специалистам в данной области техники будет понятно, или они в состоянии установить с использованием не более чем рутинных экспериментов множество эквивалентов конкретных воплощений изобретения, описанных в настоящем документе. Такие эквиваленты охвачены настоящим изобретением.

В данном описании и формуле изобретения, которые следуют, если контекст не требует иного, слово "содержать" и его вариации, такие как "содержит" и "содержащий", следует понимать как подразумевающие включение указанного целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии или группы целого числа или стадии. При использовании в настоящем документе термин "содержащий" может быть заменен термином "содержащий" или "включающий" или иногда, при использовании в настоящем документе, термином "имеющий".

Используемый в настоящем документе термин "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанный в элементе пункта формулы изобретения. При использовании в настоящем

документе термин "по существу состоящий из" не исключает материалы или стадии, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики пункта формулы изобретения. Любой из указанных выше терминов "содержащий", "содержащий", "включающий" и "имеющий" всякий раз, когда используется в настоящем документе в контексте аспекта или воплощения изобретения, может быть заменен термином "состоящий из" или "по существу состоящий из" для вариации объемов описания.

Используемый в настоящем документе соединительный термин "и/или" между несколькими перечисленными элементами понимается как охватывающий как индивидуальные, так и комбинированные варианты. Например, когда два элемента соединяются с помощью "и/или", первый вариант относится к применимости первого элемента без второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента без первого. Третий вариант относится к применимости первого и второго элементов друг с другом. Следует понимать, что любой из этих вариантов попадает в пределы значения и, следовательно, удовлетворяет требованию термина "и/или", используемого в настоящем документе. Также следует понимать, что параллельная применимость более чем одного из вариантов подпадает под значение и, следовательно, удовлетворяет требованию термина "и/или".

Используемый в настоящем документе термин "объект" означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека, к которому будет применена или уже применена обработка с помощью способа согласно воплощению изобретения. Термин "млекопитающее", используемый в настоящем документе, включает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, нечеловекообразных приматов (НЧП), таких как обезьяны, или человекообразных обезьян, людей и т.д., более предпочтительно людей.

Используемый в настоящем документе термин "защитный иммунитет" или "защитный иммунный ответ" означает, что вакцинированный объект способен контролировать инфекцию патогенным агентом, против которого была проведена вакцинация. Обычно у объекта, у которого развился "защитный иммунный ответ", развиваются только от легких до умеренных клинических симптомов или никаких симптомов вообще. Обычно объект, имеющий "защитный иммунный ответ" или "защитный иммунитет" против определенного агента, не умирает в результате инфекции указанным агентом.

"Аденовирусный капсидный белок" относится к белку на капсиде аденовируса (например, векторы Ad26, Ad35, rAd48, rAd5HVR48), который участвует в определении серотипа и/или тропизма конкретного аденовируса. Аденовирусные капсидные белки, как правило, включают белки фибер, пентон и/или гексон. Используемый в настоящем документе термин "капсидный белок" для конкретного аденовируса, такой как "капсидный белок Ad26" или "капсидный белок Ad35" может представлять собой, например, химерный капсидный белок, который содержит по меньшей мере часть капсидного белка Ad26 или Ad35. В некоторых воплощениях капсидный белок представляет собой полный капсидный белок Ad26 или Ad35. В некоторых воплощениях гексон, пентон и фибер состоят из Ad26 или Ad35.

Используемый в настоящем документе термин "совместная доставка" или "вводят вместе" относится к одновременному введению двух компонентов, таких как вирусный экспрессирующий вектор и выделенный антигенный полипептид. "Одновременное введение" может представлять собой введение двух компонентов по меньшей мере в один и тот же день. Когда два компонента "вводят вместе", они могут быть введены в виде отдельных композиций, последовательно в течение короткого периода времени, например в течение 20, 16, 12, 8 или 4 ч, или в течение 1 ч, или они могут быть введены в одной композиции одновременно.

Термины "адъювант" и "иммуностимулятор" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и определяются как одно или более веществ, которые вызывают стимуляцию иммунной системы. В этом контексте адъювант используют для усиления иммунного ответа на экспрессирующие векторы и антигенные полипептиды по изобретению, такие как аденовирусные векторы, векторы MVA, и/или антигенные полипептиды ВИЧ по изобретению.

Используемый в настоящем документе термин "инфекция" относится к инвазии хозяина посредством агента, вызывающего заболевание. Агент, вызывающий заболевание, считается "инфекционным", когда он способен заражать хозяина и реплицироваться и размножаться внутри хозяина. Примеры инфекционных агентов включают вирусы, например вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и некоторые виды аденовирусов, прионы, бактерии, грибы, простейшие и тому подобное.

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) является членом рода *Lentivirinae*, который является частью семейства *Retroviridae*. Два вида ВИЧ инфицируют людей: ВИЧ-1 и ВИЧ-2. ВИЧ-1 является наиболее распространенным штаммом вируса ВИЧ, и, как известно, более патогенным, чем ВИЧ-2. Используемые в настоящем документе термины "вирус иммунодефицита человека" и "ВИЧ" относятся к, но не ограничиваются ими, ВИЧ-1 и ВИЧ-2. В некоторых примерных воплощениях белки оболочки, описанные в настоящем документе, относятся к тем, которые присутствуют на любой из пяти серогрупп лентивирусов, которые распознаются: приматом (например, ВИЧ-1, ВИЧ-2, обезьяний вирус иммунодефицита (SIV)); овцами и козами (например, вирус висна, козий вирус артрита-энцефалита); лошадьми (вирус инфекционной анемии лошадей); кошками (например, кошачий вирус иммунодефицита (FIV)); и крупным рогатым скотом (например, вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV)) (см. Междуна-

родный комитет по систематике описаний вирусов).

ВИЧ классифицируется на несколько субтипов с высокой степенью генетической дивергенции. Используемый в настоящем документе термин "субтип ВИЧ" или "подтип ВИЧ" относится к родственным вирусам иммунодефицита человека, классифицируемым согласно степени их генетического сходства. В настоящее время существует три группы ВИЧ-1 изолятов: М, N и О. Группа М (основные штаммы) состоит из по меньшей мере десяти субтипов, А-J. Группа О (внешние штаммы) может состоять из одинакового числа субтипов. Группа N представляет собой новый изолят ВИЧ-1, который не классифицирован ни в одной группе М или О. В некоторых примерных воплощениях нейтрализующее антитело широкого спектра действия, описанное в настоящем документе, будет распознавать и повышать иммунный ответ против двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более субтипов и/или двух или более групп ВИЧ.

В изобретении обнаружено, что гетерологичные прайм-буст комбинации, в частности прайм-иммунизация экспрессирующим вектором, таким как гAd26, кодирующим один или более антигенных белков ВИЧ, с последующей буст-иммунизацией выделенным антигенным белком ВИЧ, таким как гликопротеин оболочки ВИЧ, и, предпочтительно, с дополнительной буст-иммунизацией с помощью гAd26 или MVA, кодирующих один или более антигенных белков ВИЧ, оказались на удивление эффективны по части генерации защитного иммунного ответа против одного или более субтипов ВИЧ.

Антигенные белки ВИЧ.

Используемый в настоящем документе термин "антигенный полипептид ВИЧ", "ВИЧ антигенный полипептид", "антигенный белок ВИЧ", "иммуногенный полипептид ВИЧ", или "иммуноген ВИЧ" относится к полипептиду, способному индуцировать иммунный ответ, например, гуморальный и/или клеточно-опосредованный ответ, против ВИЧ у субъекта, нуждающегося в этом. Антигенный полипептид может представлять собой белок ВИЧ, его фрагмент или эпитоп, или комбинацию нескольких белков ВИЧ, или их частей, которые могут индуцировать иммунный ответ или производить иммунитет, например защитный иммунитет, против ВИЧ у субъекта, нуждающегося в этом.

Предпочтительно, антигенный полипептид способен поднимать у хозяина защитный иммунный ответ, например индуцировать иммунный ответ против вирусного заболевания или инфекции, и/или генерировать иммунитет у объекта (т.е., вакцинированного) против вирусного заболевания или инфекции, который защищает объект от вирусного заболевания или инфекции. Например, антигенный полипептид может содержать белок или его фрагменты из обезьяньего вируса иммунодефицита (SIV), или ВИЧ, такой как белок оболочки gp160 ВИЧ или SIV, матричный/капсидный белок ВИЧ или SIV, и продукты генов gag, pol и env ВИЧ или SIV.

Согласно воплощениям изобретения антигенный полипептид может представлять собой антиген ВИЧ-1 или ВИЧ-2 или его фрагменты. Примеры антигенов ВИЧ включают, но не ограничиваются ими, продукты генов gag, pol и env, которые кодируют структурные белки и необходимые ферменты. Продукты генов gag, pol и env синтезируются в виде полипротеинов, которые далее процессируются во множество других белковых продуктов. Первичный белковый продукт гена gag представляет собой вирусный структурный белок gag-полипротеин, который дополнительно процессируется до белковых продуктов MA, CA, SP1, NC, SP2 и P6. Ген pol кодирует вирусные ферменты (Pol, полимеразу), а первичный белковый продукт дополнительно процессируется до белковых продуктов RT, RNКазы H, IN, и PR. Ген env кодирует структурные белки, специфические гликопротеины оболочки вириона. Первичный белковый продукт гена env представляет собой gp160, который далее процессируется до gp120 и gp41. Другие примеры антигенов ВИЧ включают гены регуляторных белков Tat и Rev; вспомогательные белки Nef, Vpr, Vif и Vpr; капсидные белки, нуклеокапсидные белки и вирусный белок p24. Гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты согласно изобретению может кодировать любой антиген ВИЧ и, предпочтительно, кодирует продукт гена gag, env, и/или pol, или его часть.

Согласно предпочтительному воплощению антигенный полипептид содержит антиген ВИЧ Gag, Env, или Pol, или любую ее часть, или их комбинацию, более предпочтительно антиген Gag, Env или Pol ВИЧ-1 или любую их часть или их комбинацию.

Согласно другому предпочтительному воплощению антигенный полипептид или пептид, кодируемый вектором согласно изобретению, представляет собой мозаичный антиген ВИЧ. Используемый в настоящем документе термин "мозаичный антиген" относится к рекомбинантному белку, собранному из фрагментов природных последовательностей. "Мозаичный антиген" может быть генерирован с помощью компьютера и оптимизирован с использованием генетического алгоритма. Мозаичные антигены похожи на природные антигены, но оптимизированы для максимального охвата потенциальных Т-клеточных эпитопов, обнаруженных в природных последовательностях, что улучшает широту и охват иммунного ответа.

Мозаичный антиген ВИЧ согласно изобретению предпочтительно представляет собой мозаичный антиген Gag-Pol-Env и, более предпочтительно, представляет собой мозаичный антиген Gag-Pol-Env ВИЧ-1. Используемый в настоящем документе термин "мозаичный антиген Gag-Pol-ENV ВИЧ" конкретно относится к мозаичному антигену, содержащему множественные эпитопы, полученные из одной или более последовательностей полипротеина Gag, Pol и Env ВИЧ. Эпитопные последовательности мозаич-

ных антигенов Gag-Pol-Env ВИЧ согласно изобретению напоминают последовательности природных антигенов ВИЧ, но оптимизированы, чтобы представить более широкий возможный спектр Т-клеточных эпитопов для увеличения охвата эпитопов, обнаруженных в циркулирующих последовательностях ВИЧ.

Например, для обеспечения максимального охвата потенциальных Т-клеточных эпитопов были разработаны мозаичные антигены Gag, Pol и Env с целью обеспечения оптимального охвата одного или более субтипов ВИЧ. В *in silico* базе данных рекомбинантных последовательностей фрагментов из 9 последовательных аминокислот (9-меров) выбирают такие, которые напоминают реальные белки и которые максимизируют число совпадений 9-мерных последовательностей между вакцинами-кандидатами и глобальной базой данных. Мозаичные антигены Gag, Pol и Env имеют сходную структуру домена с природными антигенами и полностью состоят из природных последовательностей без искусственных соединений. Антигены Pol могут содержать мутанты для устранения каталитической активности. Мономерные мозаичные антигены Env gp140 могут содержать точечные мутации для устранения активностей расщепления и слияния.

В одном воплощении мозаичный антиген Gag-Pol-Env ВИЧ согласно изобретению представляет собой мозаичный антиген Gag ВИЧ с эпитопами, полученными из последовательностей продуктов генов gag; мозаичный антиген Pol ВИЧ с эпитопами, полученными из последовательностей продуктов гена pol; или мозаичный антиген Env ВИЧ с эпитопами, полученными из последовательностей продуктов гена env.

Еще в одном воплощении мозаичный антиген Gag-Pol-Env ВИЧ согласно изобретению содержит комбинацию эпитопов, полученных из последовательностей продуктов генов gag, pol и/или env. Иллюстративные и неограничивающие примеры включают мозаичные антигены Env-Pol с эпитопами, полученными из последовательностей продуктов генов env и pol; мозаичные антигены Env-Gag с эпитопами, полученными из последовательностей продуктов генов env и gag; мозаичные антигены Gag-Pol с эпитопами, полученными из последовательностей продуктов генов gag и pol; и мозаичные антигены Gag-Env с эпитопами, полученными из последовательностей продуктов генов gag и env.

В еще одном воплощении мозаичный антиген Gag-Pol-Env ВИЧ согласно изобретению включает комбинацию эпитопов, полученных из последовательностей продуктов генов gag, pol, и env из одного или более субтипов.

Примеры мозаичных антигенов Gag-Pol-Env ВИЧ включают те, которые описаны, например, в публикациях US 20120076812, Barouch et al., Nat. Med. 2010, 16:319-323 [54]; Barouch et al., Cell 155:1-9, 2013 [65], каждая из которых включена в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

Предпочтительно, мозаичные антигены Gag-Pol-Env ВИЧ включают, но не ограничиваются ими, антигены, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4.

С учетом настоящего описания, мозаичный антиген ВИЧ может быть получен с использованием способов, известных в данной области техники. См., например, публикации US 20120076812, Fischer et al., Nat. Med., 2007, 13(1): p. 100-6 [53]; Barouch et al., Nat. Med., 2010, 16:319-323 [54], каждая из которых включена в настоящий документ ссылкой в полном объеме.

Гликопротеин оболочки.

Используемый в настоящем документе каждый из терминов "гликопротеин оболочки", "env гликопротеин" и "Env" относится, но не ограничивается этим, к гликопротеину, который экспрессируется на поверхности оболочки вирионов ВИЧ и поверхности плазматической мембраны ВИЧ-инфицированных клеток, или к его фрагменту, который может индуцировать иммунный ответ или генерирует иммунитет против ВИЧ у субъекта, нуждающегося в этом.

Ген env кодирует gp160, который протеолитически расщепляется на gp120 и gp41. Более конкретно, gp160 тримеризуется до (gp160)<sub>3</sub>, а затем подвергается расщеплению до двух нековалентно связанных фрагментов gp120 и gp41. Попадание вируса впоследствии опосредуется тримером гетеродимеров gp120/gp41. Gp 120 представляет собой фрагмент, связывающий рецептор, и связывается с рецептором CD4 на клетке-мишени, которая имеет такой рецептор, такая как например, Т-хелперная клетка. Gp41, который не является ковалентно связанным с gp120, представляет собой слитый фрагмент и обеспечивает вторую стадию, с помощью которой ВИЧ проникает в клетку. Gp41 первоначально погружен в вирусной оболочке, но когда gp120 связывается с рецептором CD4, gp120 изменяет свою конформацию, вызывая экспонирование gp41, где он может способствовать слиянию с клеткой-хозяином. Gp140 представляет собой нерасщепленный эктодомен тримерного gp160, т.е. (gp160)<sub>3</sub>, который был использован в качестве заместителя для нативного состояния расщепленного вирусного шипа.

Согласно одному воплощению изобретения гликопротеины env (например, gp160, gp140, gp120 или gp41), предпочтительно стабилизированный тримерный белок gp140, можно вводить для прайм- или буст-иммунизации для повышения иммунитета, индуцированного экспрессирующими векторами индивидуально.

Используемый в настоящем документе каждый из терминов "стабилизированный тримерный белок gp140" и "стабилизированный тример gp140" относится к тримеру полипептидов gp140, которые включают полипептидную последовательность, которая увеличивает стабильность тримерной структуры. Полипептиды gp140 могут иметь или могут быть модифицированы, чтобы включать в себя домен тримери-

зации, который стабилизирует тримеры gp140. Примеры доменов тримеризации включают, но не ограничиваются ими, домен тримеризации Т4-фибрилин "фолдон"; биспиральный домен тримеризации, полученный из GCN4 [66]; и каталитическую субъединицу E.coli аспартат транскарбамоилазы в качестве маркера тримера [67].

В конкретном воплощении изобретения стабилизированный тримерный белок gp140 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

Согласно воплощению изобретения стабилизированный тримерный белок gp140 можно вводить в качестве буст-иммунизации или в качестве компонента буст-иммунизации вместе с вирусными экспрессирующими векторами. Предпочтительно, стабилизированный тримерный белок gp140 представляет собой белок gp140 субтипа С или субтипа А и более предпочтительно представляет собой белок gp140 субтипа С. Тримерный белок gp140 субтипа С способен индуцировать сильнодействующие ответы нейтрализующих антител против набора вариантов ВИЧ-1 из разных субтипов и с различными чувствительностями нейтрализации у морских свинок [68, 60].

Согласно другому воплощению изобретения "гликопротеин оболочки" представляет собой мозаичный белок оболочки, содержащий множественные эпитопы, полученные из одной или более последовательностей полипротеина Env одного или более субтипов ВИЧ. Например, используемый в настоящем документе термин "белок gp140" может представлять собой "мозаичный белок gp140", который содержит множественные эпитопы, полученные из одной или более последовательностей белка gp140 одного или более субтипов ВИЧ.

В конкретном воплощении изобретения мозаичный белок gp140 представляет собой стабилизированный тример мозаичного gp140, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Выделенный белок gp140 может быть совместно доставлен с аденовирусным экспрессирующим вектором или с экспрессирующим вектором MVA. Согласно предпочтительному воплощению белок gp140 и Ad26 или MVA вводят по отдельности, в виде двух отдельных составов, или вместе в виде одного состава. Одновременное введение или совместная доставка может происходить в одно и то же время, в течение одного часа, или в тот же день. Кроме того, белок gp140 можно вводить в виде адьювантного состава. Подходящие адьюванты могут представлять собой, например, фосфат алюминия или адьювант на основе сапонина.

Антигенные полипептиды могут быть получены и выделены с помощью любого метода, известного в данной области техники в свете настоящего описания. Например, антигенный полипептид может быть экспрессирован из клетки-хозяина, предпочтительно рекомбинантной клетки-хозяина, оптимизированной для продуцирования антигенного полипептида. Согласно воплощению изобретения рекомбинантный ген используется для экспрессии белка gp140, содержащего мутации, чтобы исключить активность расщепления и слияния, предпочтительно оптимизированного белка gp140 с увеличенной шириной, интенсивностью, глубиной или продолжительностью противовирусного иммунного ответа (например, клеточного или гуморального иммунного ответа), генерированного в результате иммунизации (например, при включении в композицию по изобретению, например, в вакцину по изобретению) объекта (например, человека). Оптимизированный белок gp140 также может включать мутацию(и) сайта расщепления, сайта фактора Ха и/или домена тримеризации фолдон. Лидерная/сигнальная последовательность может быть функционально связана с N-концом оптимизированного белка gp140 для максимальной экспрессии белка. Лидерная/сигнальная последовательность обычно отщепляется от возникающего полипептида во время транспортировки в просвет эндоплазматического ретикулума. Может использоваться любая лидерная/сигнальная последовательность, подходящая для клетки-хозяина, представляющей интерес. Иллюстративная лидерная/сигнальная последовательность содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В предпочтительном воплощении изобретения выделенный антигенный полипептид представляет собой стабилизированный тримерный gp140, как описано в публикациях Nkolola et al., 2010, J. Virology 84(7): 3270-3279 [68]; Kovacs et al., PNAS 2012, 109(30):12111-6 [60], WO 2010/042942 и WO 2014/107744, каждая из которых включена в качестве ссылки в полном объеме.

#### Аденовирусы.

Аденовирус согласно изобретению принадлежит к семейству Adenoviridae и предпочтительно представляет собой такой, который принадлежит к роду Mastadenovirus. Это может быть человеческий аденовирус, но также аденовирус, который инфицирует другие виды, включающие, но не ограниченные ими, бычий аденовирус (например, бычий аденовирус 3, BAdV3), собачий аденовирус (например, CAdV2), свиной аденовирус (например, PAdV3 или 5) или обезьяний аденовирус (который включает аденовирус обезьян и аденовирус человекообразных обезьян, такой как аденовирус шимпанзе или аденовирус гориллы). Предпочтительно, аденовирус представляет собой аденовирус человека (HAdV или AdHu) или обезьяний аденовирус, такой как аденовирус шимпанзе или аденовирус гориллы (ChAd, AdCh или SAdV). В изобретении имеется в виду, что аденовирус человека относится к Ad без указания вида, например, сокращенное обозначение "Ad5" означает то же самое, что HAdV5, который является человеческим аденовирусом серотипа 5. Кроме того, используемое в настоящем документе обозначение "rAd" означает рекомбинантный аденовирус, например "rAd26" относится к рекомбинантному человеческому аденовирусу 26.

Большинство современных исследований было выполнено с использованием человеческих аденовирусов, и человеческие аденовирусы являются предпочтительными согласно некоторым аспектам изобретения. В некоторых предпочтительных воплощениях рекомбинантный аденовирус согласно изобретению основан на человеческом аденовирусе. В предпочтительных воплощениях рекомбинантный аденовирус основан на человеческом аденовирусе серотипов 5, 11, 26, 34, 35, 48, 49, 50, 52 и т.д. Согласно особенно предпочтительному воплощению изобретения аденовирус является человеческим аденовирусом одного из серотипов 26 или 35. Преимуществом этих серотипов является низкая серопревалентность и/или низкие титры ранее существующих нейтрализующих антител в человеческой популяции. Приготовление векторов гAd26 описано, например, в публикациях WO 2007/104792 и в Abbink et al., (2007) *Virology* 361(9): 4654-63 [11], которые обе включены в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме. Примеры последовательностей генома Ad26 есть в GenBank, EF 153474 и в SEQ ID NO: 1 из WO 2007/104792. Приготовление векторов гAd35 описано, например, в патенте США № 7270811, в WO 00/70071, а также в Vogels et al., (2003) *J Virol* 77(15): 8263-71 [12], которые все включены в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме. Примеры последовательностей генома Ad35 есть в GenBank, AC\_000019 и на фиг. 6 из WO 00/70071.

Обезьяньи аденовирусы, как правило, также имеют низкую серопревалентность и/или низкий титр ранее существовавших нейтрализующих антител в человеческой популяции, а также было опубликовано значительное количество работ с использованием аденовирусных векторов шимпанзе (например, US 6083716; WO 2005/071093; WO 2010/086189; WO 2010085984; Farina et al., 2001, *J. Virol.* 75: 11603-13 [13]; Cohen et al., 2002, *J. Gen. Virol.* 83: 151-55 [69]; Kobinger et al., 2006, *Virology* 346: 394-401 [70]; Tatsis et al., 2007, *Molecular Therapy* 15: 608-17 [71], см также обзор по Bangari и Mittal, 2006, *Vaccine* 24: 849-62 [72], а также обзор Lasaga и Ertl. 2009, *Mol. Ther.* 17: 1333-39 [73]). Следовательно, в других предпочтительных воплощениях рекомбинантный аденовирус согласно изобретению основан на обезьяньем аденовирусе, например аденовирусе шимпанзе. В некоторых воплощениях рекомбинантный аденовирус основан на обезьяньем аденовирусе типа 1, 7, 8, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27,1, 28,1, 29, 30, 31,1, 32, 33, 34, 35,1, 36, 37,2, 39, 40,1, 41,1, 42,1, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50 или SA7P.

Предпочтительно, аденовирусный вектор является дефицитным по репликации рекомбинантным вирусным вектором, таким как гAd26, гAd35, гAd4 8, гAd5HVR48 и т.д.

В предпочтительном воплощении согласно изобретению аденовирусные векторы содержат капсидные белки из двух редких серотипов: Ad26 и Ad35. В типичном воплощении вектор представляет собой вирус гAd26 или гAd35.

Таким образом, векторы, которые могут быть использованы в воплощении изобретения, содержат капсидный белок Ad26 или Ad35 (например, белок фибер, пентон или гексон). Среднему специалисту в данной области техники будет понятно, что нет необходимости, чтобы весь капсидный белок Ad26 или Ad35 использоваться в векторах по изобретению. Таким образом, химерные капсидные белки, которые включают по меньшей мере часть капсидного белка Ad26 или Ad35, могут быть использованы в векторах по изобретению. Векторы согласно воплощениям изобретения также могут включать капсидные белки, в которых каждый из белков: фибер, пентон и гексон, получают из различных серотипов, при условии, что по меньшей мере один капсидный белок получают из Ad26 или Ad35. В предпочтительных воплощениях каждый из белков: фибер, пентон и гексон получают из Ad26 или каждый получают из Ad35.

Среднему специалисту в данной области техники будет понятно, что элементы, полученные из нескольких серотипов, могут быть объединены в одном рекомбинантном аденовирусном векторе. Таким образом, может быть получен химерный аденовирус, который объединяет желательные свойства из различных серотипов. Таким образом, в некоторых воплощениях химерный аденовирус по изобретению может объединять отсутствие ранее существовавшего иммунитета серотипов Ad26 и Ad35 с такими характеристиками, как температурная стабильность, сборка, фиксация, выход продукта, перенаправленная или улучшенная инфекция, стабильность ДНК в клетке-мишени и тому подобное.

В некоторых воплощениях рекомбинантный аденовирусный вектор, пригодный для изобретения, является производным в основном или полностью от Ad35 или из Ad26 (т.е. вектор представляет собой гAd35 или гAd26). В некоторых воплощениях аденовирус является дефицитным по репликации, например, так как он содержит делецию в области E1 генома. Для аденовирусов по изобретению, которые получены из Ad26 или Ad35, является типичным обмен кодирующей последовательности E4-orf6 аденовируса на E4-orf6 аденовируса человеческой подгруппы C, такого как Ad5. Это позволяет размножение таких аденовирусов в хорошо известных комплементирующих клеточных линиях, которые экспрессируют гены E1 Ad5, таких как, например, клетки 293, клетки PER.C6 и тому подобное (см., например, Navenga et al., 2006, *J. Gen. Virol.* 87: 2135-43 [61], WO 03/104467). Однако такие аденовирусы будут не способны к репликации в некомплементирующих клетках, которые не экспрессируют гены E1 Ad5.

В некоторых воплощениях аденовирус представляет собой человеческий аденовирус серотипа 35 с делецией в области E1, в которую была клонирована нуклеиновая кислота, кодирующая один или более антигенных полипептидов ВИЧ, а также с областью E4-orf6 Ad5. В некоторых воплощениях аденовирус представляет собой человеческий аденовирус серотипа 26 с делецией в области E1, в которую была клонирована нуклеиновая кислота, кодирующая один или более антигенных полипептидов ВИЧ, а также с

областью E4orf6 Ad5. Для аденовируса Ad35 характерно сохранение 3'-конца открытой рамки считывания E1B 55K в аденовирусе, например 166 п.о. непосредственно выше открытой рамки считывания pIX или фрагмент, содержащий это, такой как фрагмент 243 п.о. непосредственно выше старт-кодона pIX, отмеченный на 5'-конце сайтом рестрикции Bsu36I, так как это увеличивает стабильность аденовируса, поскольку промотор гена pIX частично локализован в этой области (см., например, [61], выше; WO 2004/001032).

Получение рекомбинантных аденовирусных векторов хорошо известно в данной области техники. Получение векторов gAd26 описано, например, в публикации WO 2007/1047 92 и в Аббинк et al. (2007), *Virology*, 81 (9): 4654-63 [11]. Примеры последовательностей генома Ad26 есть в GenBank, EF 153474 и в SEQ ID NO: 1 из WO 2007/104792. Получение векторов gAd35 описано, например, в патенте США № 7270811 и в Vogels et al. (2003), *J. Virology*, 77 (15): 8263-71 [12]. Пример последовательности генома Ad35 есть в GenBank, AC\_000019.

В воплощении изобретения векторы, пригодные для изобретения, включают те, которые описаны в WO 2012/082918, описание которого включено в данный документ в качестве ссылки в полном объеме.

Как правило, вектор, пригодный для изобретения, получают с использованием нуклеиновой кислоты, содержащей цельный рекомбинантный аденовирусный геном (например, плазмидный, космидный или бакуловирусный вектор). Таким образом, в изобретении также предлагаются выделенные молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют аденовирусные векторы согласно изобретению. Молекулы нуклеиновых кислот согласно изобретению могут быть представлены в форме РНК или в форме ДНК, полученной путем клонирования или полученной синтетически. ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной.

Аденовирусные векторы, используемые в изобретении, как правило, дефицитны по репликации. В этих воплощениях вирус становится дефицитным по репликации с помощью делеции или инактивации областей, критических для репликации вируса, таких как область E1. Области могут быть по существу делетированы или инактивированы, например, путем вставки гена, представляющего интерес, такого как ген, кодирующий антигенный полипептид (обычно связанный с промотором), внутрь области. В некоторых воплощениях векторы по изобретению могут содержать делеции в других областях, таких как области E2, E3 или E4, или вставки гетерологичных генов, связанных с промотором, внутрь одной или более из этих областей. Для E2- и/или E4-мутированных аденовирусов, как правило, используются E2- и/или E4-комплементирующие клеточные линии для создания рекомбинантных аденовирусов. Мутации в области E3 аденовируса необязательно должны быть комплементированы клеточной линией, так как E3 не требуется для репликации.

Упаковочная клеточная линия, как правило, используется для получения достаточного количества аденовирусных векторов для использования в изобретении. Упаковочная клетка представляет собой клетку, которая содержит те гены, которые были делетированы или инактивированы в дефицитном по репликации векторе, таким образом позволяя вирусу реплицироваться в клетке. Подходящие упаковочные клеточные линии включают, например, PER.C6, 911, 293 и E1 A549.

Как было отмечено выше, большое разнообразие антигенных полипептидов ВИЧ могут быть экспрессированы в векторах. При необходимости гетерологичный ген, кодирующий антигенные полипептиды ВИЧ, может быть оптимизирован по кодам для обеспечения надлежащей экспрессии в хозяине, подвергнутом обработке (например, человеку). Кодон-оптимизация представляет собой технологию, широко применяемую в данной области техники. Как правило, гетерологичный ген клонируют в область E1 и/или E3 генома аденовируса.

Гетерологичный ген ВИЧ может быть под контролем промотора (т.е. функционально связан с ним), полученного из аденовируса (например, основного позднего промотора), или может быть под контролем гетерологичного промотора. Примеры подходящих гетерологичных промоторов включают промотор цитомегаловируса (CMV), и промотор вируса саркомы Рауса (RSV). Предпочтительно, промотор расположен выше представляющего интерес гетерологичного гена внутри экспрессирующей кассеты.

Как было отмечено выше, аденовирусные векторы, пригодные для изобретения, могут кодировать широкий спектр антигенных полипептидов ВИЧ, известных специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, антигенные полипептиды, описанные в настоящем документе.

В предпочтительном воплощении изобретения аденовирусные векторы представляют собой вектор gAd26, такой как описанный в публикации Abbink, J. *Virology* 2007 81 (9): p. 4654-63 [11], которая включена в настоящий документ в качестве ссылки.

#### Векторы MVA.

Векторы MVA, пригодные для изобретения, используют ослабленный вирус, полученный из модифицированного вируса коровьей оспы Анкара, который характеризуется потерей своих способностей репродуктивно реплицироваться в человеческих клеточных линиях. Векторы MVA могут экспрессировать любой из антигенных полипептидов ВИЧ, известных специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, антигенные полипептиды, описанные в настоящем документе.

MVA были получены с помощью более чем 570 последовательных пассажей дермального штамма коровьей оспы Анкара на фибробластах куриных эмбрионов [вирус коровьей оспы Хориоаллантоис, ви-

рус Анкара, CVA; для обзора см. Maug et al. (1975), *Infection* 3, 6-14 [74]], который хранится в Институте Вакцинации, Анкара, Турция, на протяжении многих лет и используется в качестве основы для вакцинации людей. Однако в связи с частыми тяжелыми осложнениями после вакцинации, связанными с вирусами коровьей оспы, было предпринято несколько попыток, чтобы сгенерировать более ослабленную, более безопасную вакцину против оспы.

В период с 1960 по 1974 г. профессору Антону Майру (Anton Maug) удалось ослабление CVA с помощью более чем 570 непрерывных пассажей в клетках CEF [74]. Было показано на различных животных моделях, что полученный MVA был авирулентным [75]. В рамках ранней разработки MVA в качестве предварительного вакцины против оспы проводили клинические испытания с использованием MVA-517 в комбинации с Lister Elstree [77, 78] у объектов с повышенным риском развития побочных реакций от коровьей оспы. В 1976 году MVA, полученный из семенного фонда MVA-571 (что соответствует 571-му пассажиру), был зарегистрирован в Германии в качестве прайм-вакцины в двухстадийной программе парентеральной вакцинации против оспы. Впоследствии, MVA-572 был использован у приблизительно 120000 европейцев, большинство детей в возрасте от 1 до 3 лет, без сообщений о серьезных побочных эффектах, хотя многие из объектов относились к популяции с высоким риском развития осложнений, связанных с коровьей оспой [76]. MVA-572 был депонирован в Европейской коллекции животных клеточных культур под номером ECACC V94012707.

В результате пассирования, используемого для ослабления MVA, был получен ряд различных штаммов или изолятов в зависимости от числа пассажей, проведенных в клетках CEF. Например, MVA-572 использовали в малой дозе в качестве предварительного вакцины в Германии во время программы ликвидации оспы, и MVA-575 широко использовался в качестве ветеринарной вакцины. MVA, а также MVA-BN лишены приблизительно 15% (31 т.п.о. из шести областей) генома по сравнению с родительским вирусом CVA. Делеции влияют на количество генов вирулентности и генов широкого круга хозяев, а также на ген телец включения типа А. MVA-575 был депонирован 7 декабря 2000 г. в Европейской коллекции животных клеточных культур (ECACC) под регистрационным No. V00120707. Ослабленный CVA-вирус MVA (модифицированный вирус коровьей оспы Анкара) был получен путем последовательного пассирования (более 570 пассажей) CVA на первичном фибробластах куриных эмбрионов.

Несмотря на то что Maug et al. продемонстрировал в 1970-х, что MVA является сильно ослабленным и авирулентным в организме человека и млекопитающих, некоторые исследователи сообщали, что MVA не полностью ослаблен в клеточных линиях млекопитающих и человека, так как в этих клетках может происходить остаточная репликация [79, 80; патент США № 5185146; 81]. Предполагается, что результаты, представленные в этих публикациях, были получены с использованием различных известных штаммов MVA, так как используемые вирусы существенно отличаются по своим свойствам, в частности, в их поведении по части роста в различных клеточных линиях. Такая остаточная репликация является нежелательной по различным причинам, включая проблемы безопасности в связи с использованием в организме человека.

Штаммы MVA, имеющие улучшенные профили безопасности для разработки более безопасных продуктов, таких как вакцины или фармацевтические препараты, были разработаны, например, Bavarian Nordic. MVA дополнительно пассировали в Bavarian Nordic и обозначали как MVA-BNA. Типичный образец MVA-BN был депонирован 30 августа 2000 г. в Европейской коллекции клеточных культур (ECACC) под регистрационным No. V00083008. MVA-BN дополнительно описан в публикациях WO 02/42480 (US 2003/0206926) и WO 03/048184 (US 2006/0159699), каждая из которых включена в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

"Производные" или "варианты" MVA относятся к вирусам, проявляющим по существу те же самые характеристики репликации, как MVA, как описано в настоящем документе, но с различиями в одной или в нескольких частях их геномов. Например, MVA-BN, а также производное или вариант MVA-BN не способны репродуктивно реплицироваться *in vivo* в организме человека и мышей, даже у мышей с сильно подавленной иммунной системой. Более конкретно, MVA-BN или производное или вариант MVA-BN также предпочтительно обладает способностью к репродуктивной репликации в фибробластах куриных эмбрионов (CEF), но не обладает способностью репродуктивной репликации в человеческой клеточной линии кератиноцитов HaCat [82], человеческой клеточной линии остеосаркомы кости 143В (ECACC Депозит No. 91112502), человеческой эмбриональной клеточной линии 293 клеток почки (ECACC депозит No. 85120602), человеческой клеточной линии аденокарциномы шейки матки HeLa (ATCC депозит No. CCL-2). Кроме того, производное или вариант MVA-BN имеет степень амплификации вируса, по меньшей мере в два раза меньше, более предпочтительно в три раза меньше, чем MVA-575 в клетках HeLa и в клеточных линиях HaCaT. Тесты и анализы для этих свойств вариантов MVA описаны в WO 02/42480 (US 2003/0206926) и WO 03/048184 (US 2006/0159699).

Термин "не способный к репродуктивной репликации" или "нет возможности репродуктивной репликации" описан, например, в WO 02/42480, в котором также раскрыто, как получить MVA, обладающий целевыми свойствами, как упомянуто выше. Термин относится к вирусу, который имеет степень амплификации вирусов через 4 дня после инфицирования, составляющий менее чем 1, как установлено с использованием анализов, описанных в WO 02/42480 или в патенте США № 6761893, которые оба включены

ны в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

Термин "не способен репродуктивно реплицироваться" относится к вирусу, который имеет коэффициент вирусной амплификации через 4 дня после инфекции, составляющий менее чем 1. Анализы, описанные в WO 02/42480 или в патенте США № 6761893, применимы для определения коэффициента вирусной амплификации.

Амплификация или репликации вируса обычно выражается как отношение вируса, продуцированного из инфицированной клетки (выход) к количеству первоначально примененному для инфицирования клетки (вход), и обозначается как "степень амплификации". Степень амплификации "1" определяет состояние амплификации, где количество вируса, продуцированного из инфицированных клеток, является таким же, как количество, исходно примененное для инфицирования клеток, а это означает, что инфицированные клетки перmissive для вирусной инфекции и репродукции. Напротив, степень амплификации меньше чем 1, т.е. снижение уровня выхода по сравнению с уровнем входа указывает на отсутствие репродуктивной репликации и, следовательно, на ослабление вируса.

Преимущества вакцины на основе MVA включают их профиль безопасности, а также доступность для крупномасштабного производства вакцины. Кроме того, в дополнение к ее эффективности, целесообразность производства в промышленных масштабах может быть выгодной. Кроме того, вакцины на основе MVA могут доставить множество гетерологичных антигенов и позволяют одновременную индукцию гуморального и клеточного иммунитета.

Векторы MVA, пригодные для данного изобретения, могут быть получены с использованием способов, известных в данной области, таких как способы, описанные в WO 2002/042480, WO 2002/24224, US 20110159036, США 8197825 и т.д., соответствующее описание которой включено в настоящий документ с помощью ссылок.

В другом аспекте, вирусные штаммы MVA, дефицитные по репликации, также могут быть пригодны для использования в изобретении, такие как штаммы MVA-572 и MVA-575 или любой другой аналогично ослабленный штамм MVA. Также может быть пригодным мутантный MVA, такой как вирус коровьей оспы Анкара с делегированным хориоаллантаоисом (dCVA). dCVA содержит делеционные сайты del I, del II, del III, del IV, del V, и del VI генома MVA. Сайты особенно полезны для вставки множества гетерологичных последовательностей. dCVA может репродуктивно реплицироваться (со степенью амплификации более чем 10) в человеческой клеточной линии (такой как человеческие клеточные линии 293, 143B и MRC-5), что затем дает возможность оптимизации путем дополнительной мутации, полезной для стратегии вакцинации на основе вируса (см. WO 2011/092029).

В предпочтительном воплощении изобретения вектор MVA содержат нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или более антигенных белков ВИЧ, таких, как мозаичный антиген ВИЧ. В других предпочтительных воплощениях векторы MVA кодируют один или более антигенных полипептидов ВИЧ, включающие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4, и более предпочтительно кодируют четыре антигенных полипептида ВИЧ, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие антигенный белок ВИЧ, могут быть вставлены в одну или более межгенных областей (IGR) MVA. В некоторых воплощениях IGR выбирают из IGR07/08, IGR 44/45, IGR 64/65, IGR 88/89, IGR 136/137 и 148/149 IGR. В некоторых воплощениях менее чем 5, 4, 3, или 2 IGR рекомбинантного MVA содержат гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты ВИЧ, такие как мозаичный антиген и/или дополнительный антигенный полипептид ВИЧ. Гетерологичные нуклеотидные последовательности дополнительно или в качестве альтернативы могут быть вставлены в один или более из встречающихся в природе делеционных сайтов, в частности в основные делеционные сайты I, II, III, IV, V или VI генома MVA. В некоторых воплощениях менее чем 5, 4, 3 или 2 из встречающихся в природе делеционных сайтов рекомбинантного MVA включают гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты гликопротеином оболочки ВИЧ и/или дополнительный белок ВИЧ.

Число сайтов вставки MVA, содержащих гетерологичные нуклеотидные последовательности, кодирующие антигенные детерминанты белка ВИЧ, может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более. В некоторых воплощениях гетерологичные нуклеотидные последовательности вставляют в 4, 3, 2, или меньшее количество сайтов вставки. Предпочтительно, используют два сайта вставки. В некоторых воплощениях используют три сайта вставки. Предпочтительно, рекомбинантный MVA содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6 или 7 генов, вставленные в 2 или 3 сайта вставки.

Рекомбинантные вирусы MVA, представленные в настоящем документе, могут быть получены обычными методами, известными в данной области техники. Методы получения рекомбинантных поксвирусов или методы вставки экзогенных кодирующих последовательностей в поксвирусный геном хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, стандартные методы молекулярной биологии, такие как клонирование ДНК, выделение ДНК и РНК, Вестерн-блот-анализ, методы амплификации ОТ-ПЦР и ПЦР описаны в Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2-е изд.) [83], и методы для работы и манипуляций с вирусами описаны в Virology Methods Manual [B.W.J. Mahy et al. (eds.), Academic Press (1996)]. Аналогичным образом, методы и технологии для работы, манипуляций и генной ин-

женерии MVA описаны в *Molecular Virology: A Practical Approach* [A.J. Davison & R.M. Elliott (Eds.), The Practical Approach Series, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK (1993) (см., например, главы 9: Экспрессия генов вирусными векторами вируса коровьей оспы)] и *Current Protocols in Molecular Biology* [John Wiley & Son, Inc. (1998) (см., например, главу 16, раздел IV: Экспрессия белков в клетках млекопитающих с использованием вирусного вектора вируса коровьей оспы)].

Для генерации различных рекомбинантных MVA, описанных в настоящем документе, могут применяться различные способы. Последовательность ДНК для интеграции в вирус может быть помещена в плазмидный конструкт *E.coli*, в который вставлена ДНК, гомологичная области ДНК MVA. Отдельно, последовательность ДНК для вставки может быть лигирована с промотором. Связь промотор-ген может так располагаться в плазмидном конструкте, чтобы она была фланкирована на обоих концах с помощью ДНК, гомологичной последовательности ДНК, фланкирующей область ДНК MVA, содержащей несущественный локус. Полученный плазмидный конструкт может быть амплифицирован путем размножения в бактерии *E.coli* и выделен. Выделенная плаزمида, содержащая последовательность ДНК гена для вставки, может быть трансфицирована в клеточную культуру, например в фибробласты куриных эмбрионов (CEFS), в то же время культуру инфицируют MVA. Рекомбинация между гомологичной ДНК MVA в плазмиде и вирусным геномом, соответственно, может генерировать MVA, модифицированный присутствием чужеродных ДНК-последовательностей.

Согласно предпочтительному воплощению клетка подходящей клеточной культуры, такая как, например, клетка CEF, может быть инфицирована поксвирусом. Инфицированная клетка может быть в дальнейшем трансфицирована первым плазмидным вектором, содержащим чужеродный или гетерологичный ген или гены, предпочтительно под транскрипционным контролем элемента контроля экспрессию поксвируса. Как объяснялось выше, плазмидный вектор также содержит последовательности, способные направлять вставку экзогенной последовательности в выбранную часть поксвирусного генома. Необязательно, плазмидный вектор также содержит кассету, содержащую ген-маркер и/или ген селекции, функционально связанный с промотором поксвируса. Подходящий маркер или ген селекции представляют собой, например, гены, кодирующие зеленый флуоресцентный белок,  $\beta$ -галактозидазу, неомицин-фосфорибозилтрансферазу или другие маркеры. Использование кассеты селекции или маркеров упрощает идентификацию и выделение генерируемого рекомбинантного поксвируса. Однако рекомбинантный поксвирус также может быть идентифицирован с помощью ПЦР-технологии. Впоследствии, еще одна клетка может быть инфицирована рекомбинантным поксвирусом, полученным, как описано выше, и может быть трансфицирована вторым вектором, содержащим второй чужеродный или гетерологичный ген или гены. В случае, когда этот ген должен быть введен в другой сайт интеграции поксвирусного генома, второй вектор также отличается в поксвирусных-гомологичных последовательностях, направляющих интеграцию второго чужеродного гена или генов в геном поксвируса. После осуществления гомологичной рекомбинации может быть выделен рекомбинантный вирус, содержащий два или более чужеродных или гетерологичных гена. Для введения дополнительных чужеродных генов в рекомбинантный вирус стадии инфекции и трансфекции могут быть повторены с использованием рекомбинантного вируса, выделенного в предыдущих стадиях для инфекции и с помощью дополнительного вектора, содержащего дополнительный чужеродный ген или гены для трансфекции.

В качестве альтернативы, стадии инфекции и трансфекции, как описано выше, являются взаимозаменяемыми, т.е. подходящая клетка может быть сначала трансфицирована плазмидным вектором, содержащим чужеродный ген, и затем инфицирована поксвирусом. В качестве дополнительной альтернативы, также возможно вводить каждый чужеродный ген в различные вирусы, совместно инфицировать клетку всеми полученными рекомбинантными вирусами и проводить скрининг для рекомбинанта, включающего все чужеродные гены. Третьей альтернативой является лигирование ДНК генома и чужеродных последовательностей *in vitro* и восстановление рекомбинированного ДНК-генома вируса коровьей оспы с помощью вируса-помощника. Четвертая альтернатива представляет собой гомологичную рекомбинацию в *E.coli* или в других видах бактерий между геномом вируса коровьей оспы, клонированным в виде бактериальной искусственной хромосомы (BAC), и линейной чужеродной последовательностью, фланкированной последовательностями ДНК, гомологичными последовательностям, фланкирующим целевой сайт интеграции в геном вируса коровьей оспы.

Гетерологичный ген ВИЧ, например нуклеиновая кислота, кодирующая один или более антигенных полипептидов ВИЧ, могут быть под контролем одного или более поксвирусных промоторов (т.е. функционально связаны с ним). В некоторых воплощениях промотор представляет собой поксвирусный промотор Pr7.5, гибридный ранний/поздний промотор или промотор PrS, промотор PrS5E, синтетический или природный ранний или поздний промотор или промотор АТ1 вируса коровьей оспы.

В предпочтительном воплощении изобретения векторы MVA экспрессируют поливалентные мозаичные антигены Env/Gag/Pol, такие как те, что описаны в публикациях Barouch et al., *Nat. Med.*, 2010, 16:319-323 [54]; Barouch et al., *Cell* 155:1-9, 2013 [65], которые все включены в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме. Согласно воплощениям изобретения векторы MVA могут экспрессировать любой из антигенных полипептидов, описанных в настоящем документе, включая, но не ограничиваясь ими, мозаичные антигены ВИЧ, такие как мозаичные антигены ВИЧ Gag-Pol-Env.

Иммуногенные композиции.

Используемый в настоящем документе термин "иммуногенно эффективное количество" или "иммунологически эффективное количество" означает количество композиции, достаточное, чтобы вызвать целевой иммунный эффект или иммунный ответ у субъекта, нуждающегося в этом. В одном воплощении иммуногенно эффективное количество означает количество, достаточное для индукции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом. В другом воплощении иммуногенно эффективное количество означает количество, достаточное для получения иммунитета у субъекта, нуждающегося в этом, например, для обеспечения защитного эффекта против таких заболеваний, как вирусная инфекция. Иммуногенно эффективное количество может варьировать в зависимости от множества факторов, таких как физическое состояние объекта, возраст, масса, состояние здоровья и т.д.; конкретного применения, будь то индукция иммунного ответа или обеспечение защитного иммунитета; конкретного вводимого рекомбинантного вектора; иммуногена, кодируемого вводимым рекомбинантным вектором; специфического вводимого антигенного полипептида; и конкретного заболевания, например вирусной инфекции, для которой требуется иммунитет. Иммуногенно эффективное количество может быть легко определено обычным специалистом в данной области техники с учетом настоящего описания.

В качестве общего руководства иммуногенно эффективное количество при использовании со ссылкой на рекомбинантный вирусный вектор может находиться в диапазоне примерно от  $10^8$  вирусных частиц примерно до  $10^{12}$  вирусных частиц, например  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$  или  $10^{12}$  вирусных частиц. Иммуногенно эффективное количество может быть введено в виде одной композиции, или в нескольких композициях, как, например, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 композициях (например, в таблетках, капсулах или инъекционных композициях), где введение нескольких капсул или инъекций в совокупности обеспечивает объекта иммуногенно эффективным количеством. В общем случае, при использовании в отношении полипептида, такого как выделенный антигенный полипептид, иммуногенно эффективное количество может варьироваться, например, примерно от 0,3 примерно до 3000 мкг, например 1-1000 мкг, например 10-500 мкг, например примерно 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 мкг. Кроме того, можно вводить иммуногенно эффективное количество объекту, а затем вводить еще одну дозу иммуногенно эффективного количества тому же объекту по так называемой схеме прайм-буст. Эта общая концепция схемы прайм-буст хорошо известна специалисту в области вакцин. Дополнительные бустерные введения необязательно при необходимости могут быть добавлены в схему.

Иммуногенные композиции представляют собой композиции, содержащие иммуногенно эффективное количество очищенных или частично очищенных аденовирусных или MVA-векторов для применения в изобретении. Указанные композиции могут быть изготовлены в виде вакцины (также называемой как "иммуногенная композиция") в соответствии с методами, хорошо известными в данной области техники. Такие композиции могут включать адъюванты для усиления иммунного ответа. Оптимальные соотношения каждого компонента в составе могут быть определены с помощью методик, хорошо известных специалистам в данной области техники с учетом настоящего описания.

Приготовление и применение иммуногенных композиций хорошо известны специалистам в данной области техники. Жидкие фармацевтические композиции, как правило, включают жидкий носитель, такой как вода, нефть, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Также могут быть включены физиологический солевой раствор, раствор декстрозы или раствор другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

Композиции по изобретению могут содержать другие антигены ВИЧ-1, или прайм- или буст-иммунизации могут содержать другие антигены. Другие антигены, используемые в комбинации с аденовирусными векторами по изобретению, не критичны для изобретения и могут представлять собой, например, антигены ВИЧ-1 и нуклеиновые кислоты, их экспрессирующие.

Иммуногенные композиции, используемые в изобретении, могут включать адъюванты. Адъюванты, подходящие для совместного введения согласно изобретению, должны быть такими, которые потенциально безопасны, хорошо переносимы и эффективны у людей, включая QS-21, Detox-PC, MPL-SE, MoGM-CSF, TiterMax-G, CRL-1005, GERBU, TERamide, PSC97B, Adjuver, PG-026, GSK-I, GcMAF, В-алетин, MPC-026, Adjuvax, CpG ODN, Бетафектин, соли алюминия (например, AdjuPhos), Adjuplex и MF59.

Другие адъюванты, которые могут быть введены, включают лектины, факторы роста, цитокины и лимфокины, такие как  $\alpha$ -интерферон,  $\gamma$ -интерферон, фактор роста тромбоцитов (PDGF), гранулоцит-колониестимулирующий фактор (gCSF), гранулоцит-макрофаг-колониестимулирующий фактор (gMCSF), фактор некроза опухолей (TNF), эпидермальный фактор роста (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и IL-12 или нуклеиновые кислоты, кодирующие их.

Композиции по изобретению могут содержать фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны препятствовать эффективности активного ингредиента. Точная природа носителя или другого материала может зависеть от способа введения, например внутримышечного, подкожного, перорального, внутривенного, кожного, внутрь слизистой (например, кишечника), интраназального или внутрибрюшинного пути.

Способность индуцировать или стимулировать иммунный ответ против ВИЧ при введении в организм животного или человека может быть оценена либо *in vitro*, либо *in vivo* с использованием разнообразных анализов, которые являются стандартными в данной области техники. Для общего описания методов, доступных для оценки проявления и активации иммунного ответа, см., например, Coligan et al. (1992 and 1994, *Current Protocols in Immunology*; ed. J. Wiley & Sons Inc., National Institute of Health). Измерение клеточного иммунитета может быть осуществлено путем измерения профилей цитокинов, секретированных активированными эффекторными клетками, включающими те, которые получены из CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток (например, путем количественной оценки IL-10- или IFN- $\gamma$ -продуцирующих клеток с помощью ELISPOT), путем определения состояния активации иммунных эффекторных клеток (например, анализа пролиферации Т-клеток с помощью классического поглощения [<sup>3</sup>H] тимидина), путем проведения анализа на антиген-специфических Т-лимфоцитах у сенсibilизированного объекта (например, пептид-специфический лизис в анализе на цитотоксичность и т.д.).

Способность стимулировать клеточный и/или гуморальный ответ может быть определена путем связывания антител и/или конкуренции за связывание (см., например, Harlow, 1989, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press). Например, титры антител, вырабатываемых в ответ на введение композиции, обеспечивающей иммуноген, могут быть измерены с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Иммунные ответы также могут быть измерены с помощью анализа нейтрализующих антител, где нейтрализацию вируса определяют как потерю инфекционности с помощью реакции/ингибирования/нейтрализации вируса с помощью специфического антитела. Иммунный ответ может быть дополнительно измерен с помощью анализа антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP).

Согласно воплощениям изобретения при введении объекту экспрессирующий вектор, такой как рекомбинантный аденовирусный вектор или рекомбинантный вектор MVA, экспрессирует иммуногенный полипептид. Любой из антигенных полипептидов, описанных в настоящем документе, может кодироваться экспрессирующим вектором, и его могут вводить объекту в способе по изобретению. Экспрессированный иммуногенный полипептид презентуется иммунной системе объекта, индуцируя таким образом целевой ответ для выработки иммунитета, или индуцируя иммунный ответ для лечения или предотвращения заболевания или инфекции. Например, ответом может быть выработка антител, специфичных для иммуногенного полипептида.

Предпочтительно, при введении объекту экспрессирующий вектор экспрессирует мозаичный антиген Gag-Pol-Env ВИЧ. Презентирование мозаичного антигена Gag-Pol-Env ВИЧ согласно изобретению иммунной системе объекта может индуцировать выработку антител, специфичных к продуктам генов gag, pol и/или env ВИЧ в зависимости от состава последовательности, экспрессированной мозаичным антигеном ВИЧ.

Комбинированная вакцина.

Общий аспект изобретения относится к комбинированной вакцине для индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у субъекта, нуждающегося в этом, содержащей

первую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество одного или более экспрессирующих векторов, кодирующих один или более антигенных полипептидов ВИЧ, и фармацевтически приемлемый носитель;

вторую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида и фармацевтически приемлемый носитель; и

иммуногенно эффективное количество одного или более дополнительных экспрессирующих векторов, кодирующих один или более дополнительных антигенных полипептидов,

где одна из первой и второй композиций предназначена для прайм-иммунизации, а другая композиция предназначена для буст-иммунизации, и иммуногенно эффективное количество дополнительных экспрессирующих векторов присутствует во второй композиции или в третьей композиции для введения вместе со второй композицией для прайм- или буст-иммунизации.

В предпочтительном воплощении выделенный антигенный полипептид включает гликопротеин оболочки ВИЧ. Примеры гликопротеина оболочки включают любой из гликопротеинов оболочки ВИЧ, описанные выше, включая, но не ограничиваясь ими, gp160, gp120, gp140 или gp41 из любого субтипа ВИЧ. Предпочтительно, выделенный антигенный полипептид содержит стабилизированный тримерный белок оболочки ВИЧ, такой как стабилизированный тример gp140 ВИЧ, в частности стабилизированный тример gp140 ВИЧ субтипа С, как, например, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. В другом воплощении изобретения гликопротеин оболочки ВИЧ представляет собой мозаичный гликопротеин оболочки ВИЧ, такой как мозаичный белок gp140 ВИЧ, как, например, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В другом предпочтительном воплощении экспрессирующий вектор или дополнительный экспрессирующий вектор является аденовирусным вектором или вектором MVA. Предпочтительно, векторы различного происхождения используются для прайм- и буст-иммунизации. Например, когда аденовирусный вектор используется для прайм-иммунизации, вектор MVA используется для буст-иммунизации. Точно так же, когда вектор MVA используется для прайм-иммунизации, аденовирусный вектор используется для буст-иммунизации. В предпочтительном воплощении изобретения один или более аденови-

русных векторов, более предпочтительно векторы гAd26, используются для прайм-иммунизации, и один или более векторов MVA вместе с выделенным антигенным полипептидом ВИЧ, таким как белок оболочки ВИЧ, используются для буст-иммунизации.

В других воплощениях изобретения один или более аденовирусных векторов, предпочтительно векторы гAd26, используются для прайм-иммунизации, и один или более аденовирусных векторов, предпочтительно гAd26 векторы вместе с выделенным антигенным полипептидом ВИЧ, таким как белок оболочки ВИЧ, предпочтительно стабилизированный тримерный белок gp140, используются для буст-иммунизации. Аденовирусные векторы, используемые для буст-иммунизации, могут кодировать одинаковые антигенные белки, кодируемые аденовирусными векторами, используемыми для прайм-иммунизации.

Еще в одном воплощении изобретения выделенный антигенный полипептид ВИЧ и один или более аденовирусных векторов, предпочтительно векторы гAd26, используются для прайм-иммунизации, и выделенный антигенный полипептид ВИЧ и один или более аденовирусных векторов, предпочтительно векторы гAd26, используются для буст-иммунизации.

Согласно воплощениям изобретения любой из антигенных полипептидов ВИЧ, рассмотренных выше, может кодироваться с помощью экспрессирующего вектора(ов) и дополнительного экспрессирующего вектора(ов). В предпочтительном воплощении антигенный полипептид представляет собой мозаичный антиген ВИЧ, более предпочтительно мозаичный антиген Gag-Pol-Env ВИЧ. Примеры мозаичных антигенов Gag-Pol-Env ВИЧ включают, но не ограничиваются ими, мозаичные антигены, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-4.

В одном воплощении изобретения первая композиция содержит векторы гAd26, кодирующие один или более мозаичных антигенных полипептидов ВИЧ, таких как мозаичные антигены Gag-Pol-Env ВИЧ; вторая композиция содержит выделенный белок оболочки ВИЧ, такой как стабилизированный тример gp140 ВИЧ или мозаичный белок оболочки ВИЧ; и дополнительные экспрессирующие векторы представляют собой векторы MVA, кодирующие один или более мозаичных антигенных полипептидов ВИЧ, таких как мозаичный антиген Gag-Pol-Env ВИЧ.

В предпочтительном воплощении изобретения первая композиция содержит векторы гAd26, кодирующие один или более белков, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-4; вторая композиция содержит выделенный антигенный полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6; и дополнительные экспрессирующие векторы представляют собой векторы MVA, кодирующие один или более белков, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-4.

В особенно предпочтительном воплощении изобретения первая композиция содержит векторы гAd26, кодирующие три мозаичных белка ВИЧ, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 соответственно; вторая композиция содержит выделенный стабилизированный тример gp140 ВИЧ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и векторы MVA присутствуют в третьей композиции и кодируют четыре мозаичных антигенных белка ВИЧ, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-4.

Согласно воплощению изобретения первая композиция может содержать один экспрессирующий вектор или более чем один экспрессирующий вектор. В одном воплощении первая композиция содержит один экспрессирующий вектор, такой как аденовирусный вектор, и более предпочтительно, вектор гAd26. В другом воплощении первая композиция содержит более чем один экспрессирующий вектор, такой как один, два, три, или четыре и т.д. экспрессирующих вектора, которые предпочтительно представляют собой аденовирусные векторы, такие как векторы гAd26. Один или более экспрессирующих векторов могут экспрессировать одинаковые или различные антигенные полипептиды ВИЧ. Каждый из экспрессирующих векторов может экспрессировать одну последовательность антигенного полипептида ВИЧ, или более чем одну последовательность антигенного полипептида ВИЧ. В качестве иллюстративного и неограничивающего примера первая композиция может содержать три вектора гAd26, каждый из которых экспрессирует отличный антигенный полипептид ВИЧ, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4, и более предпочтительно SEQ ID NO: 1, 3 и 4.

Согласно воплощениям изобретения один или более дополнительных экспрессирующих векторов могут представлять собой один экспрессирующий вектор или более чем один экспрессирующий вектор, например два, три, четыре или более экспрессирующих векторов. Один или более дополнительных экспрессирующих векторов могут экспрессировать одинаковые или различные антигенные полипептиды. Каждый из еще одного дополнительного экспрессирующего вектора может экспрессировать одну последовательность антигенного полипептида или более последовательностей антигенных полипептидов. В качестве иллюстративного и неограничивающего примера используются два дополнительных экспрессирующих вектора, предпочтительно векторы MVA, причем каждый вектор MVA кодирует различные последовательности мозаичных антигенов ВИЧ, таких как последовательности мозаичных антигенов Gag-Pol-Env ВИЧ, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4. Предпочтительно, в таком воплощении изобретения, один вектор MVA кодирует антигенные полипептиды ВИЧ, содержащие SEQ ID NO: 1 и 3, а другой вектор MVA кодирует антигенные полипептиды ВИЧ, содержащие SEQ ID NO: 2 и 4.

Комбинированная вакцина согласно воплощениям изобретения является эффективной для индукции иммунного ответа против одного или более субтипов ВИЧ.

Способ индукции защитного иммунитета против ВИЧ-инфекции.

В изобретении предлагается способ прайминга и бустинга иммунного ответа на один или более субтипов ВИЧ у субъекта, нуждающегося в этом, с использованием одного или более экспрессирующих векторов в комбинации с выделенным антигенным полипептидом.

Согласно одному общему аспекту изобретения способ индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у субъекта, нуждающегося в этом, включает:

(i) введение объекту первой композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество одного или более экспрессирующих векторов, кодирующих один или более антигенных полипептидов ВИЧ, и фармацевтически приемлемый носитель;

(ii) введение объекту второй композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида и фармацевтически приемлемый носитель;

(iii) введение объекту иммуногенно эффективного количества одного или более дополнительных экспрессирующих векторов, кодирующих один или более дополнительных антигенных полипептидов ВИЧ,

где стадии (a) и (b) осуществляют в любом порядке, причем одна из стадий предназначена для прайм-иммунизации, а другая - для буст-иммунизации, и иммуногенно эффективное количество одного или более дополнительных экспрессирующих векторов присутствует во второй композиции или в третьей композиции, вводимой вместе со второй композицией для прайм- или буст-иммунизации.

Любая из комбинированных вакцин согласно воплощениям изобретения может быть использована в способе по настоящему изобретению.

Согласно воплощениям изобретения "индукция иммунного ответа" при использовании в отношении способов, описанных в настоящем документе, охватывает предоставление защитного иммунитета и/или вакцинацию объекта против инфекции, такой как ВИЧ-инфекция, в профилактических целях, а также в терапевтических целях с целью вызвать целевой иммунный ответ или эффективный ответ у субъекта, нуждающегося в этом, против инфекции, такой как ВИЧ-инфекции. Предпочтительно, способы по изобретению предназначены для профилактических целей, например для обеспечения защитного иммунитета.

Воплощения выделенных антигенных полипептидов, экспрессирующих векторов, дополнительных экспрессирующих векторов, антигенных полипептидов, кодируемых экспрессирующими векторами и т.д., которые могут быть использованы в способах по настоящему изобретению, описаны подробно выше, и в иллюстративных примерах, приведенных ниже.

В одном воплощении описанных способов один или более аденовирусных векторов, кодирующих один или более антигенных полипептидов ВИЧ, используются для прайминга иммунного ответа. Один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ могут быть использованы вместе с одним или более аденовирусными векторами для прайм-иммунизации. Прайм-иммунизацию можно вводить несколько раз, например исходное прайм-введение в момент времени 0, а затем другое прайм-введение примерно через 10-14 недель после исходного прайм-введения. Один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ вместе с одним или более дополнительными аденовирусными векторами или векторами MVA, кодирующими один или более дополнительных антигенных полипептидов ВИЧ, которые используются для бустинга иммунного ответа. Буст-иммунизацию также можно вводить несколько раз, например сначала примерно через 22-26 недель после исходного прайм-введения, а затем другое буст-введение примерно через 46-50 недель после исходного прайм-введения. При этом иммунный ответ, индуцированный иммунизацией, контролируется.

Воплощения описанных способов также предусматривают более короткие схемы прайм-буст, означая, что конечную буст-иммунизацию вводят примерно через 22-26 недель после исходного прайм-введения. Прайм-иммунизацию можно вводить в неделю 0. Буст-иммунизацию можно вводить несколько раз, например сначала примерно через 7-9 недель или 11-13 недель после исходного прайм-введения, а затем другое буст-введение примерно через 22-26 недели после исходного прайм-введения. В некоторых воплощениях один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ вводят вместе с одним или более аденовирусными векторами для прайм-иммунизации.

Специалистам в данной области техники легко понять, что схема для прайм- и буст-введения может быть скорректирована на основе измеренных иммунных ответов после введений. Например, буст-композиции обычно вводят через несколько недель или месяцев после введения прайм-композиции, например примерно через 2-3 недели, или 4 недели, или 8 недель, или 16 недель, или 20 недель, или 24 недели, или 28 недель, или 30 недель, или 32 недели, или через один-два года после введения прайм-композиции.

В предпочтительном воплощении изобретения аденовирусные векторы, используемые в способах, раскрытых в настоящем документе, включают вектор гAd26. В одном примерном воплощении вектор гAd26 используется для прайминга иммунного ответа, и вектор MVA вместе с выделенным антигенным полипептидом используется для бустинга иммунного ответа или наоборот.

В одном или более воплощениях описанного способа множество векторов гAd26 используются для

прайминга иммунного ответа, и множество выделенных антигенных белков, необязательно, вместе с множеством векторов MVA используются для бустинга иммунного ответа или наоборот.

В предпочтительном воплощении согласно способу настоящего документа множество векторов rAd26 используются для прайм-иммунизации с последующей буст-иммунизацией с использованием множества векторов MVA и выделенного антигенного полипептида. Предпочтительно, буст-иммунизации вводят через 10-36 недель после последней прайм-иммунизации, более предпочтительно через 12-24 недели после прайм-иммунизации.

Антигены в соответствующих прайм- и буст-композициях (однако используется много буст-композиций), необязательно должны быть идентичными, но должны разделять антигенные детерминанты или быть по существу похожи друг на друга.

Введение иммуногенных композиций, содержащих экспрессирующие векторы и/или антигенные полипептиды, обычно осуществляют внутримышечно или подкожно. Однако другие способы введения, такие как внутривенное, кожное, внутрикожное или назальное, также могут быть предусмотрены. Внутримышечное введение иммуногенных композиций может быть достигнуто с помощью иглы для инъекции суспензии экспрессирующих векторов, например аденовирусных и/или векторов MVA, и/или антигенных полипептидов. Альтернативой является использование устройства безыгольного инъектора для введения композиции (с использованием, например, Biojector™) или лиофилизованного порошка, содержащего вакцину.

Для внутривенной, кожной или подкожной инъекции или инъекции в пораженный участок вектор будет представлен в форме парентерально приемлемого водного раствора, который является свободным от пирогенов и имеет подходящее значение pH, изотоничности и стабильности. Аналогично, выделенный антигенный полипептид будет представлен в форме парентерально приемлемого раствора, имеющего подходящее значение pH, изотоничности и стабильности. Обычные специалисты в данной области техники вполне в состоянии приготовить соответствующие растворы с использованием, например, изотонических носителей, таких как хлорид натрия для инъекций, раствор для инъекций Рингера, раствор для инъекций Рингера с лактатом. Консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки могут быть включены по мере необходимости. Состав с замедленным высвобождением также может быть использован.

Как правило, введение вакцинных композиций согласно воплощениям изобретения будет иметь профилактические цели, чтобы генерировать иммунный ответ против антигена ВИЧ перед инфекцией или до развития симптомов. Заболевания и расстройства, которые могут подвергаться лечению или предотвращаться согласно изобретению, включают в себя те, в которых иммунный ответ может играть защитную или терапевтическую роль. В других воплощениях экспрессирующие векторы, например аденовирусные, и/или векторы MVA, и/или антигенные полипептиды могут быть введены для профилактики после контакта.

Иммуногенные композиции, содержащие экспрессирующие векторы, например аденовирусные векторы и/или векторы MVA, и антигенные полипептиды, вводят объекту, порождая иммунный ответ против ВИЧ у объекта. Количество композиции, достаточное, чтобы вызвать детектируемый иммунный ответ, определяется как "иммуногенно эффективная доза". Как показано в приведенных ниже примерах, иммуногенные композиции по изобретению индуцируют гуморальный, а также клеточно-опосредованный иммунный ответ. В типичном воплощении изобретения иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ.

Фактическое количество вводимого препарата, а также скорость и временной курс введения будут зависеть от природы и тяжести состояния, которое подвергается лечению. Назначение лечения, например решения по дозировке и т.д., находится в пределах ответственности врачей общей практики и других медицинских работников, или в контексте ветеринарии в пределах ответственности ветеринара, и, как правило, учитывает расстройство, подлежащее лечению, состояние индивидуального пациента, место доставки, способ введения и другие факторы, известные практикующим специалистам. Примеры методик и протоколов, упомянутых выше, можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>th</sup> edition, Osol A. ed., 1980.

После получения аденовирусных векторов и векторов MVA и необязательного состава из таких частиц в композициях векторы могут быть введены индивидууму, в частности человеку или другому примату. Введение может быть осуществлено для человека или другого млекопитающего, например мыши, крысы, хомяка, морской свинки, кролика, овцы, козы, свиньи, лошади, коровы, осла, обезьяны, собаки или кошки. Доставка отличному от человека млекопитающему необязательно должна осуществляться для терапевтических целей, но может быть осуществлена для использования в экспериментальном контексте, например, в исследовании механизмов иммунного ответа на белок gp140 или антигены, экспрессированные аденовирусными векторами или векторами MVA.

В одной примерной схеме аденовирусный вектор или вектор MVA вводят (например, внутримышечно) в количестве в интервале примерно от 100 мкл до 10 мл солевого раствора, содержащего концентрации примерно от  $10^4$  до  $10^{12}$  вирусных частиц/мл. Как правило, аденовирусный вектор или вектор MVA вводят в количестве примерно от  $10^9$  примерно до  $10^{12}$  вирусных частиц (вч) на человека во время

одного введения, более типично примерно от  $10^{10}$  примерно до  $10^{12}$  вч. За исходной вакцинацией следует буст-вакцинация, как описано выше. Выделенный антигенный полипептид ВИЧ, например, может быть введен в количестве в интервале примерно от 0,001 до 30 мг/на 1 кг массы тела. Специалисту в данной области будет понятно, что определенные факторы могут оказывать влияние на дозировку, необходимую для эффективного лечения объекта, включая, но не ограничиваясь ими, тяжесть заболевания или расстройства, предыдущее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст объекта, а также присутствие других заболеваний.

Композиция может, если целесообразно, быть представлена в наборе, упаковке или в распределяющем устройстве, которые могут содержать одну или более стандартных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. Набор, например, может содержать металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка. Набор, упаковка или распределяющее устройство могут сопровождаться инструкциями для введения.

Композиции по изобретению могут быть введены индивидуально или в комбинации с другими способами лечения, либо одновременно, либо последовательно в зависимости от состояния, подлежащего лечению, а также от других факторов, которые могут влиять на лечение.

Воплощения.

Воплощение 1 представляет собой комбинированную вакцину для индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у субъекта, нуждающегося в этом, содержащую:

(i) первую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество одного или более экспрессирующих векторов, кодирующих один или более антигенных полипептидов ВИЧ, и фармацевтически приемлемый носитель;

(ii) вторую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида и фармацевтически приемлемый носитель; и

(iii) иммуногенно эффективное количество одного или более дополнительных экспрессирующих векторов, кодирующих один или более дополнительных антигенных полипептидов,

где одна из первой и второй композиций предназначена для прайм-иммунизации, а другая композиция - для буст-иммунизации, и иммуногенно эффективное количество дополнительных экспрессирующих векторов присутствует во второй композиции или в третьей композиции для введения вместе со второй композицией для прайм- или буст-иммунизации.

Воплощение 2 представляет собой комбинированную вакцину согласно воплощению 1, где выделенный антигенный полипептид включает гликопротеин оболочки ВИЧ.

Воплощение 3 представляет собой комбинированную вакцину согласно воплощению 2, где выделенный антигенный полипептид содержит стабилизированный тример gp140 ВИЧ.

Воплощение 4 представляет собой комбинированную вакцину согласно любому из воплощений 1-3, где один или более экспрессирующих векторов, и один или более дополнительных экспрессирующих векторов представляют собой аденовирусные векторы или векторы MVA.

Воплощение 5 представляет собой комбинированную вакцину согласно воплощению 4, где один или более экспрессирующих векторов представляют собой векторы rAd26, и один или более дополнительных экспрессирующих векторов представляют собой векторы MVA; один или более экспрессирующих векторов представляют собой векторы MVA и один или более дополнительных экспрессирующих векторов представляют собой векторы rAd26; или один или более экспрессирующих векторов представляют собой векторы rAd26, и один или более дополнительных экспрессирующих векторов также представляют собой векторы rAd26.

Воплощение 6 представляет собой комбинированную вакцину согласно любому из воплощений 1-5, где один или более экспрессирующих векторов и один или более дополнительных экспрессирующих векторов кодируют один или более антигенных полипептидов ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4.

Воплощение 7 представляет собой комбинированную вакцину согласно воплощению 6, где один или более экспрессирующих векторов представляют собой векторы rAd26, кодирующие один или более антигенных полипептидов ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4; выделенный антигенный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6; и один или более дополнительных экспрессирующих векторов представляют собой векторы MVA, кодирующие один или более антигенных полипептидов ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4.

Воплощение 8 представляет собой комбинированную вакцину согласно воплощению 7, где первая композиция предназначена для прайм-иммунизации, а вторая композиция и иммуногенно эффективное количество одного или более дополнительных экспрессирующих векторов предназначены для буст-иммунизации.

Воплощение 9 представляет собой комбинированную вакцину согласно воплощению 8, где иммуногенно эффективное количество одного или более дополнительных экспрессирующих векторов присутствует в третьей композиции.

Воплощение 10 представляет собой комбинированную вакцину согласно воплощению 9, где первая композиция содержит векторы гAd26, кодирующие три антигенных полипептида ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 соответственно; выделенный антигенный полипептид содержит стабилизированный тример gp140 ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; а третья композиция содержит векторы MVA, кодирующие четыре антигенных полипептида ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

Воплощение 11 представляет собой комбинированную вакцину согласно любому из воплощений 1-10, где введение комбинированной вакцины объекту индуцирует иммунный ответ против нескольких субтипов ВИЧ.

Воплощение 12 представляет собой комбинированную вакцину согласно любому из воплощений 1-11 для применения в генерации защитного иммунного ответа против ВИЧ-инфекции, где первая композиция используется для прайминга иммунного ответа, а вторая композиция и иммуногенно эффективное количество одного или более дополнительных экспрессирующих векторов используются для бустинга иммунного ответа.

Воплощение 13 представляет собой набор, включающий комбинированную вакцину любого из воплощений 1-12.

Воплощение 14 представляет собой способ индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает:

(i) введение объекту первой композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество одного или более экспрессирующих векторов, кодирующих один или более антигенных полипептидов ВИЧ, и фармацевтически приемлемый носитель;

(ii) введение объекту второй композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида и фармацевтически приемлемый носитель; и

(iii) введение объекту иммуногенно эффективного количества одного или более дополнительных экспрессирующих векторов, кодирующих один или более дополнительных антигенных полипептидов ВИЧ,

где стадии (i) и (ii) осуществляют в любом порядке, где одна из стадий предназначена для прайм-иммунизации, а другая - для буст-иммунизации, и иммуногенно эффективное количество одного или более дополнительных экспрессирующих векторов присутствует во второй композиции или в третьей композиции, вводимой вместе со второй композицией для прайм- или буст-иммунизации.

Воплощение 15 представляет собой способ согласно воплощению 14, где выделенный антигенный полипептид содержит гликопротеин оболочки ВИЧ.

Воплощение 16 представляет собой способ согласно воплощению 15, где выделенный антигенный полипептид содержит стабилизированный тример gp140 ВИЧ.

Воплощение 17 представляет собой способ по любому из воплощений 14-16, где один или более экспрессирующих векторов и один или более дополнительных экспрессирующих векторов представляют собой аденовирусные векторы или векторы MVA.

Воплощение 18 представляет собой способ согласно воплощению 17, где один или более экспрессирующих векторов представляют собой векторы гAd26, и один или более дополнительных экспрессирующих векторов представляют собой векторы MVA; один или более экспрессирующих векторов представляют собой векторы MVA, и один или более дополнительных экспрессирующих векторов представляют собой векторы гAd26; или один или более экспрессирующих векторов представляют собой векторы гAd26, и один или более дополнительных экспрессирующих векторов также представляют собой векторы гAd26.

Воплощение 19 представляет собой способ согласно любому из воплощений 14-18, где один или более экспрессирующих векторов и один или более дополнительных экспрессирующих векторов кодируют один или более антигенных полипептидов ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4.

Воплощение 20 представляет собой способ согласно воплощению 19, где один или более экспрессирующих векторов представляют собой векторы гAd26, кодирующие один или более антигенных полипептидов ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4; выделенный антигенный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6; и один или более дополнительных экспрессирующих векторов представляют собой векторы MVA, кодирующие один или более антигенных полипептидов ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4.

Воплощение 21 представляет собой способ согласно воплощению 20, где первая композиция предназначена для прайм-иммунизации, вторая композиция и иммуногенно эффективное количество одного или более дополнительных экспрессирующих векторов для буст-иммунизации.

Воплощение 22 представляет собой способ согласно воплощению 21, где иммуногенно эффективное количество одного или более дополнительных экспрессирующих векторов присутствует в третьей композиции.

Воплощение 23 представляет собой способ согласно воплощению 22, где первая композиция содержит векторы rAd26, кодирующие три антигенных полипептида ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 соответственно; выделенный антигенный полипептид содержит стабилизированный тример gp140 ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; а третья композиция содержит векторы MVA, кодирующие четыре антигенных полипептида ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

Воплощение 24 представляет собой способ согласно любому из воплощений 14-23, где введение комбинированной вакцины объекту индуцирует иммунный ответ против нескольких субтипов ВИЧ.

Воплощение 25 представляет собой способ индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает:

(i) введение объекту прайм-вакцины, содержащей иммуногенно эффективное количество одного или более экспрессирующих векторов, кодирующих один или более антигенных полипептидов ВИЧ, и фармацевтически приемлемый носитель; и

(ii) введение объекту буст-вакцины, содержащей иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида ВИЧ, иммуногенно эффективное количество одного или более дополнительных экспрессирующих векторов, кодирующих один или более дополнительных антигенных полипептидов ВИЧ, и фармацевтически приемлемый носитель,

где выделенный антигенный полипептид и один или более дополнительных экспрессирующих векторов присутствуют в той же самой композиции или в отдельных композициях; и

где буст-вакцину вводят после введения прайм-вакцины.

Воплощение 26 представляет собой способ согласно воплощению 25, где буст-вакцину вводят в первый раз примерно через 22-26 недель после исходного введения прайм-вакцины.

Воплощение 27 представляет собой способ согласно воплощению 25 или 26, дополнительно содержащий стадию повторного введения прайм-вакцины объекту после исходного введения прайм-вакцины, но перед первым введением буст-вакцины.

Воплощение 28 представляет собой способ согласно воплощению 27, где прайм-вакцину повторно вводят примерно через 10-14 недель после исходного введения прайм-вакцины.

Воплощение 29 представляет собой способ согласно любому из воплощений 25-28, дополнительно содержащий повторное введение буст-вакцины объекту.

Воплощение 30 представляет собой способ согласно воплощению 29, где буст-вакцину повторно вводят примерно через 22-26 недель после предыдущего введения буст-вакцины.

Воплощение 31 представляет собой способ согласно любому из воплощений 25-30, где один или более экспрессирующих векторов представляют собой векторы rAd26, и один или более дополнительных экспрессирующих векторов представляют собой векторы MVA; один или более экспрессирующих векторов представляют собой векторы MVA и один или более дополнительных экспрессирующих векторов представляют собой векторы rAd26; или один или более экспрессирующих векторов представляют собой векторы rAd26, и один или более дополнительных экспрессирующих векторов также представляют собой векторы rAd26.

Воплощение 32 представляет собой способ согласно любому из воплощений 25-30, где один или более экспрессирующих векторов представляют собой векторы rAd26, кодирующие один или более антигенных полипептидов ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4; где выделенный антигенный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6; и один или более дополнительных экспрессирующих векторов представляют собой векторы rAd26 или векторы MVA, кодирующие один или более антигенных полипептидов ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4.

Воплощение 33 представляет собой способ согласно воплощению 32, где один или более дополнительных экспрессирующих векторов представляют собой векторы rAd26.

Воплощение 34 представляет собой способ согласно воплощению 32, где один или более дополнительных экспрессирующих векторов представляют собой векторы MVA.

Воплощение 35 представляет собой способ согласно воплощению 25, где буст-вакцину вводят в первый раз примерно через 8-12 недель после исходного введения прайм-вакцины и повторно вводят примерно через 24 недели после исходного введения прайм-вакцины.

Воплощение 36 представляет собой способ согласно воплощению 35, где прайм-вакцина дополнительно содержит иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида ВИЧ, где выделенный антигенный полипептид ВИЧ присутствует в той же самой композиции или в отдельной композиции.

Воплощение 37 представляет собой способ согласно любому из воплощений 34-35, где один или более экспрессирующих векторов представляют собой векторы rAd26, кодирующие одну или более последовательностей антигенного полипептида ВИЧ, предпочтительно, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4; где выделенный антигенный

полипептид представляет собой гликопротеин оболочки ВИЧ, предпочтительно содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6; и один или более дополнительных экспрессирующих векторов представляют собой векторы гAd26 или векторы MVA, кодирующие одну или более последовательностей антигенного полипептида ВИЧ, предпочтительно содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4.

Воплощение 38 представляет собой способ согласно воплощению 37, где один или более экспрессирующих векторов представляют собой векторы гAd26, кодирующие последовательности антигенного полипептида ВИЧ SEQ ID NO: 1, 3 и 4; и один или более дополнительных экспрессирующих векторов представляют собой векторы гAd26, кодирующие последовательности антигенного полипептида ВИЧ SEQ ID NO: 1, 3 и 4.

Воплощение 39 представляет собой способ индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает:

(i) введение объекту прайм-вакцины, содержащей иммуногенно эффективное количество одного или более экспрессирующих векторов гAd26, кодирующих антигенные полипептиды ВИЧ SEQ ID NO: 1, 3 и 4, и фармацевтически приемлемый носитель; и

(ii) введение объекту буст-вакцины, содержащей иммуногенно эффективное количество выделенного гликопротеина оболочки ВИЧ, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, и фармацевтически приемлемый носитель; и

где буст-вакцину вводят после введения прайм-вакцины.

Воплощение 40 представляет собой способ согласно воплощению 39, где буст-вакцина содержит адьювант, предпочтительно соль алюминия, и, более предпочтительно, фосфат алюминия.

Воплощение 41 представляет собой способ согласно воплощению 39 или 40, где выделенный гликопротеин оболочки ВИЧ в буст-вакцине содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

Воплощение 42 представляет собой способ согласно любому из воплощений 39-41, где вторая прайм-вакцина, содержащая иммуногенно эффективное количество одного или более экспрессирующих векторов гAd26, кодирующих антигенные полипептиды ВИЧ SEQ ID NO: 1, 3 и 4, и фармацевтически приемлемый носитель вводят объекту после стадии (i) и перед стадией (ii).

Воплощение 43 представляет собой способ согласно любому из воплощений 39-42, где дополнительную буст-вакцину, содержащую иммуногенно эффективное количество выделенного гликопротеина оболочки ВИЧ, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, предпочтительно SEQ ID NO: 5, и фармацевтически приемлемый носитель, вводят объекту после стадии (ii).

Воплощение 44 представляет собой способ согласно любому из воплощений 39-43, где иммуногенно эффективное количество выделенного гликопротеина оболочки ВИЧ, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, составляет 250 мкг.

Воплощение 45 представляет собой способ согласно любому из воплощений 39-44, где иммуногенно эффективное количество одного или более экспрессирующих векторов гAd26, кодирующих антигенные полипептиды ВИЧ SEQ ID NO: 1, 3 и 4, состоит из трех векторов гAd26, из которых первый вектор кодирует антигенный полипептид ВИЧ SEQ ID NO: 1, второй вектор кодирует антигенный полипептид ВИЧ SEQ ID NO: 3, и третий вектор кодирует антигенный полипептид ВИЧ SEQ ID NO: 4, где три экспрессирующих вектора гAd26 вводят в общей дозе  $5 \times 10^{10}$  вч.

Следующие примеры изобретения представлены для дополнительной иллюстрации сущности изобретения. Следует понимать, что следующие примеры не ограничивают изобретение и объем настоящего изобретения должен определяться прилагаемой формулой изобретения.

### Примеры

Пример 1. Исследование схем вакцин против ВИЧ на нечеловекообразных приматах.

Исследование на животных проводили с целью идентификации схемы поливалентной вакцины против ВИЧ-1 для дальнейшей перспективной разработки. Исследование тестировало расширенную схему вакцинации с использованием двух прайм-иммунизации (в недели 0 и 12) и первой буст-иммунизации (на 24-й неделе). Вторую буст-иммунизацию вводили на 52-й неделе. В частности, исследование тестировало влияние использования комбинации аденовирусного вектора или вектора MVA вместе с гликопротеином оболочки в гетерологичных комбинированных вакцинах. Гуморальный и клеточный иммунологические ответы тестировали на вакцинированных нечеловекообразных приматах (которых также называют "НЧП").

Вакцинация и дизайн эксперимента.

Макак-резус (*Macaca mulatta*) (НЧП) вакцинировали с использованием четырех различных вакцинных платформ с использованием 12 животных на группу (группы II-V) в дополнение к двум контрольным группам (группы I и VI), также с использованием 12 животных в каждой. Первая контрольная группа (группа I) получала прайм- и буст-вакцины векторов Ad26, экспрессирующих гены: мозаичный Env1 ВИЧ-1 (SEQ ID NO: 1), мозаичный GagPol1 (SEQ ID NO: NO 3), и мозаичный GagPol2 (SEQ ID NO: 4), без выделенного антигенного белка ВИЧ. Векторы Ad26 называют "Ad26.mos1Env, Ad26.mos1Gag-Pol и Ad26.mos2Gag-Pol, соответственно, и совместно обозначают как "Ad26mos". Вторая контрольная группа (группа VI) получала только плацебо ("Sham") прайм- и буст-вакцин.

Все группы, кроме группы VI, получали две прайм-вакцины с Ad26mos на неделях 0 и 12, с последующим введением первой буст-вакцины на 24-й неделе. Следующую буст-вакцину вводили в 52-й неделе.

В частности, группа II получала две прайм-вакцины Ad26mos, а затем две буст-вакцины с 250 мкг Env gp140 тримерного белка субтипа С (SEQ ID NO: 5), которые вводили с адьювантом фосфатом алюминия (далее по тексту "gp140 лекарственный продукт" или "gp140 DP"). Группа III получала две прайм-вакцины Ad26mos, а затем две буст-вакцины вместе с совместно поставляемыми Ad26mos и gp140 DP. Группа IV получала две прайм-вакцины Ad26mos, а затем две буст-вакцины с композицией, содержащей два различных вектора MVA: один вектор MVA, экспрессирующий мозаичный ген Env1 (SEQ ID NO: 1) и мозаичный ген GagPol1 (SEQ ID NO: 3), и другой вектор MVA, экспрессирующий мозаичный ген Env2 (SEQ ID NO: 2), и мозаичный ген GagPol2 (SEQ ID NO: 4), причем гены находятся в отдельных местах расположения на векторах. Векторы MVA обозначаются "MVA.mos1Env/Gag-Pol" и "MVA.mos2Env/Gag-Pol", и совместно обозначаются как "MVAmos". Группа V получала две прайм-вакцины Ad26mos, а затем две буст-вакцины для совместной доставки MVAmos и gp140 DP. Эти вакцинные схемы, тестируемые на НЧП, суммированы в табл. 1А ниже.

Таблица 1А. Вакцинные схемы, тестируемые на НЧП

Группа	0 недель	12 недель	24 недели	52 недели
Группа I	Ad26 <sub>mos</sub> <sup>1</sup>	Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub>
Группа II	Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub>	gp140 DP <sup>3</sup>	gp140 DP
Группа III	Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub> +gp140 DP	Ad26 <sub>mos</sub> +gp140 DP
Группа IV	Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub>	MVA <sub>mos</sub> <sup>2</sup>	MVA <sub>mos</sub>
Группа V	Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub>	MVA <sub>mos</sub> +gp140 DP	MVA <sub>mos</sub> +gp140 DP
Группа VI	Sham	Sham	Sham	Sham

<sup>1</sup>Ad26mos=Ad26mos1Gag-Pol+Ad26mos1Env+Ad26.mos2Gag-Pol ( $5 \times 10^{10}$  вч суммарно);

<sup>2</sup>MVAmos=MVA.mos1Env/Gag-Pol+MVA.mos2Env/Gag-Pol ( $1 \times 10^8$  БОЕ суммарно);

<sup>3</sup>gp140 DP=очищенный Env gp140 тримерный белок субтипа С вводили с адьювантом (250 мкг белка+0,425 мг фосфата алюминия), полученным путем спонтанного смешивания.

Следующие начальные эксперименты ядра анализа, включающие анализы связывания антител ИФА, анализы антитело-зависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и ELISPOT-анализы проводили на образцах, взятых у НЧП, обработанных согласно схемам, описанным в табл. 1А, на 28-й неделе и/или через 54/56 недель после исходного введения прайм-вакцины. Эксперимент заражения обезьяньим/человеческим вирусом иммунодефицита (SHIV) осуществляли на 72 неделе.

Анализ ИФА связывания антитела (Ab).

ВИЧ-1-специфический гуморальный ответ определяли на 28- и 56-й неделе с помощью модифицированного твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА). Лунки в одном ряду 96-луночных планшетов (Nunc) покрывали с использованием 10 мкг (C97ZA.012) белка gp140 субтипа С (SEQ ID NO: 5) или 10 мкг мозаичного белка 1 (SEQ ID NO: 6), разведенного в 10 мл 1× фосфатно-солевого буфера Дульбекко (DPBS) (Gibco/Life Technologies) в количестве 100 мкл на лунку и инкубировали в течение ночи при 4°C. Известный образец положительной сыворотки из ранее проведенного исследования использовали в качестве положительного контроля и образец сыворотки до вакцинации использовали в качестве отрицательного контроля.

Лунки планшетов промывали один раз 200 мкл промывочного раствора ИФА (1000 мл PBS (1×) и 0,5 мл Tween 20 (Sigma)). Лунки блокировали с помощью 250 мкл блокирующего раствора (блокатор казеина в PBS (Pierce)) и инкубировали при комнатной температуре в течение 3-4 ч. После инкубации блокирующий раствор удаляли. Затем 150 мкл блокирующего раствора и 6 мкл образца сыворотки добавляли к первому ряду каждого планшета и 100 мкл блокирующего раствора во все остальные лунки. Затем на планшете проводили последовательные разведения 50 мкл в 100 мкл блокирующего раствора, и 50 мкл удаляли из последнего ряда, так чтобы в каждой лунке было 100 мкл образца. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Содержимое лунок отбрасывали, а затем лунки промывали 3 раза 200 мкл промывочного раствора ИФА.

Затем добавляли в каждую лунку 100 мкл 1:2000 вторичного антитела пероксидаза-AffiniPure козьего антитела против человеческого IgG (Jackson ImmunoResearch Labs) в блокирующем растворе. Планшеты снова инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч и промывали 3 раза Промывочным раствором ИФА. Лунки проявляли с помощью 100 мкл раствора SeruBlue TMB Microwell (KPL Laboratories), и проявку останавливали через 0,5 мин с помощью 100 мкл TMB стоп-раствора (KPL Research Products).

Планшеты считывали на планшет-ридере ИФА при 450 и 550 нм (Molecular Devices-VersaMax, и SoftMax Pro 4.7.1 программное обеспечение). Титры ИФА ЕС<sub>90</sub> рассчитывали с использованием следующего уравнения (I), в котором переменные были получены из подбора 4-параметрической кривой, полу-

ченной с помощью SoftMaxPro

$$EC_F = \left( \frac{F}{100-F} \right)^{1/N} \cdot EC_{50}$$

(I), где N представляет собой угол наклона и F представляет собой ответ в процентах.

Статистический анализ данных проводили с помощью непараметрического сравнения с контролем с использованием метода Данна для совместного ранжирования, и группу с самым высоким средним геометрическим титра определяли как контрольную соответственно.

Результаты, полученные из аналитических экспериментов ИФА gp140 (C97) субтипа С и Мозаичного белка 1 (Mos1), суммированы на фиг. 1А (неделя 28) и на фиг. 1В (неделя 56). Антигены gp140 Env субтипа С и мозаичный 1 Env демонстрировали хорошую корреляцию без смещения (данные не показаны).

Анализ антитело-зависимого клеточного фагоцитоза (ADCP).

Ответы функциональных не-нейтрализующих антител измеряли с использованием антител иммуноглобулина G (IgG), очищенных из образцов сыворотки, полученных на 28-й неделе из подвергнутых обработке НЧП. IgG очищали с помощью колонок Melon Gel (Thermo Scientific) и количественно оценивали с использованием NanoDrop спектрофотометра (Thermo Scientific). Анализы ADCP проводили, как описано в публикации Ackerman et al. (2011) (A robust, high-throughput assay to determine the phagocytic activity of clinical antibody samples. *J. Immunol. Methods* 366, 8-19), которая включена в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

Более конкретно, антиген Env субтипа С (C97) (SEQ ID NO: 5) и Mosaic M (mos 1) (SEQ ID NO: 6) Env биотинилированный антиген инкубировали с 1 мкм желто-зеленых флуоресцентных нейтравидиновых гранул (Invitrogen) в течение ночи. Затем гранулы промывали и ресуспендировали с конечным разведением 1:100 в фосфатно-солевом буферном растворе - бычьим сывороточном альбумине (PBS-BSA). Антитела, очищенные из образцов сыворотки и  $9 \times 10^5$  антиген-меченых гранул, смешивали в круглодонном 96-луночном планшете, и планшет инкубировали в течение 2 ч. Человеческие моноцитарные клетки, полученные из клеток острого миелоидного лейкоза (клетки THP-1,  $2 \times 10^4$  клеток), затем добавляли в каждую лунку до конечного объема 200 мкл и планшет инкубировали в течение ночи.

На следующий день половину объема культуры удаляли и заменяли на 100 мкл 4% параформальдегида до того, как планшеты анализировали на BD LSR II проточном цитометре, оборудованном планшет-ридером HTS. Для анализа образцы селектировали на живые клетки и определяли пропорцию клеток THP-1, фагоцитирующих гранулы. Фагоцитарный показатель рассчитывали следующим образом: (процент положительных гранул) умноженный на (среднюю интенсивность флуоресценции положительных гранул).

Результаты, полученные в анализе ADCP на 28-й неделе, суммировали на фиг. 2, который демонстрирует ответ индивидуальных животных в виде фагоцитарного показателя. Статистический анализ данных проводили с помощью непараметрических сравнений для всех пар с использованием метода Данна для совместного ранжирования.

Антигены gp140 Env субтипа С и Mosaic M Env демонстрировали хорошую корреляцию, без смещения, которая согласуется с результатами анализа ИФА, описанного выше, и анализа нейтрализующих антител (NAb), описанного ниже.

Анализ нейтрализующих антител (NAb).

Ответы нейтрализующего антитела (NAb) против псевдовирюсов Env ВИЧ-1 уровня 1 измеряли с использованием анализов нейтрализации вирусов на основе люциферазы в клетках TZM.bl. В частности, вирусы в панели 1-го уровня включали MW965.26 (субтип С), SF162.LS (субтип В), MN-3 (субтип А), DJ263.8 (субтип А) и BaL.26 (субтип В).

Вкратце, 96-луночные плоскодонные планшеты покрывали образцами сыворотки, полученными из НЧП на 56 неделе, и делали трехкратные разведения образцов сыворотки в 100 мкл 10% модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM). Затем добавляли 200 TCID<sub>50</sub> вируса (инфекционная доза тканевой клеточной культуры или количество патогенного агента, который будет производить патологические изменения в 50% инокулированной клеточной культуры) в каждую лунку в объеме 50 мкл. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C. TZM.bl клетки затем добавляли в количестве  $1 \times 10^4$  клеток/на лунку в объеме 100 мкл 10% DMEM, содержащей DEAE-декстран (Sigma) в конечной концентрации 11 мкг/мл.

IC<sub>50</sub> рассчитывали как разведение сыворотки, которое приводило к снижению в относительных единицах люминесценции 50% по сравнению с неразбавленным контролем вируса, после вычитания относительных единиц люминесценции клеточного контроля (клетки TZM.bl без присутствия какого-либо вируса).

Результаты анализа нейтрализации ВИЧ-1 уровня 1 TZM-bl против MW965.26 (субтип С), SF162.LS (субтип В), MN-3 (субтип А), DJ263.8 (субтип А) и BaL.26 (субтип В) в образцах, полученных из НЧП в неделю 56, показаны на фиг. 3. Символы представляют собой log<sub>10</sub>-трансформированные ID<sub>50</sub> титры из отдельных подопытных животных со средними геометрическими титров групп, указанных в виде горизонтальных линий. Результаты анализа nAb согласуются с результатами анализа ИФА.

## Анализ ELISPOT.

ВИЧ-1-специфический клеточный иммунный ответ оценивали с помощью IFN- $\gamma$  ELISPOT-анализа, как описано ранее в публикации Liu et al., 2009, Nature 457: 87-91, которая включена в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме. Для анализов ELISPOT использовали пулы пептидов ВИЧ-1 потенциальных Т-клеточных эпитопов (PTE), охватывающих глобальные потенциальные человеческие Т-клеточные эпитопы. В более ранних исследованиях для анализов клеточного иммунитета использовали подпулы из 10-16 пептидов, охватывающих каждый антиген с последующим картированием эпитопов с использованием индивидуальных пептидов, в основном так, как нами уже ранее сообщалось в публикации Barouch et al., 2010, Nat. Med. 16:319-323 [54], которая включена в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме. Ответы эпитоп-специфических CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов определяли с помощью исследования истощения клеток.

Вкратце, иммуногенность обработанных НЧП оценивали в образцах, полученных на 54 неделе с помощью ELISPOT-анализов IFN- $\gamma$  с использованием пептидных пулов PTE. Мононуклеары периферической крови (МКПК) стимулировали с помощью пептидных пулов PTE, и после инкубации клетки промывали, метили и проявляли для визуализации клеток, образующих пятна. Результаты анализа ELISPOT, выраженные в виде среднего значения пятно-образующих единиц (SFU) на 10<sup>6</sup> PBMC, показаны на фиг. 4.

## Выводы исследования.

Как показано с помощью результатов исследований на животных, описанных выше, и как представлено на фиг. 1-4, комбинация векторов гAd и/или векторов MVA с выделенным антигенным полипептидом в комбинациях прайм-буст применима для повышения спектра действия ВИЧ-специфических гуморальных и клеточных иммунных ответов у приматов. В частности, была продемонстрирована польза включения белка gp140 в одну или более буст-иммунизаций для повышения спектра действия ВИЧ-специфических гуморального и клеточного иммунного ответа у приматов. Кроме того, было продемонстрировано, что все тестируемые вакцинные схемы являются иммуногенными для всех иммунизированных животных (группа II-V).

В частности, введение одного или более векторов гAd26 (неделя 0 и 12), экспрессирующих один или более антигенов ВИЧ, с последующей буст-иммунизацией на 24 и 52 неделе с использованием векторов гAd26 или векторов MVA и выделенного белка gp140 субтипа С приводило к эффективному усилению гуморального ответа на ВИЧ-1, как показано с помощью результатов анализов ИФА и ADCP (см. фиг. 1A, 1B и 2, в частности группа III (с маркировкой "Ad26/Ad26+Env") и группа V (с маркировкой "Ad26/MVA+Env")). Кроме того, с помощью введения одного или более векторов гAd26 с последующей буст-иммунизацией на 24 и 52 неделе с помощью векторов MVA вместе или без белка gp140 субтипа С удалось значительно повысить клеточные иммунные ответы, измеренные с помощью анализа ELISPOT (см. фиг. 4, в частности, группа IV (с маркировкой "Ad26/MVA") и группа V (с маркировкой "Ad26/MVA+Env")).

## Пример 2. Исследование вакцинных схем против ВИЧ у людей.

Осуществляли следующее многоцентровое, рандомизированное, в параллельных группах, плацебо-контролируемое, двойное слепое клиническое исследование на здоровых ВИЧ-неинфицированных взрослых мужчинах и женщинах: фаза 1/2а исследования для оценки безопасности/переносимости и иммуногенности схем гомологичной векторной вакцины Ad26 Mosaic или гетерологичной векторной вакцины Ad26 Mosaic и MVA Mosaic с высокой дозой, с низкой дозой или при отсутствии белка gp140 субтипа С вместе с адьювантом для предотвращения ВИЧ. Это исследование продолжается.

## Общее обоснование.

Исследование осуществляют с целью оценки безопасности/переносимости и иммуногенности семи вакцинных схем прайм-буст. Объекты получали четыре дозы исследуемой вакцины: Ad26mos или плацебо получали на неделе 0 и 12; и Ad26mos или MVAmos, обе вместе или без лекарственного продукта гликопротеина 140 (низкой или высокой дозы) или только плацебо получали на 24 и 48 неделе.

Используемые в исследовании вакцины представляют собой Ad26mos, MVAmos и gp 140 DP ниже (см. также пример 1):

(i) Ad26mos состоит из следующих трех вакцинных продуктов, поставляемых в одной ампуле, и которые вводят в соотношении 2:1:1 Ad26.Mos1Env, Ad26.Mos1Gag-Pol и Ad26.Mos2Gag-Pol, экспрессирующие мозаичные гены ВИЧ-1 Env1 (SEQ ID NO: 1), GagPol1 (SEQ ID NO: NO 3) и GagPol2 (SEQ ID NO: 4) соответственно;

(ii) MVAmos состоит из следующих двух вакцинных продуктов, которые поставляют в отдельных ампулах и вводят в соотношении 1:1: MVA-Mosaic1 (вирус MVA, экспрессирующий мозаичные белки Mosaic1 ВИЧ-1 Gag, Pol и Env белки, имеющие SEQ ID NO: 1 и 3) и MVA-Mosaic2 (вирус MVA, экспрессирующий мозаичные белки Mosaic2 ВИЧ-1 Gag, Pol и Env, имеющие SEQ ID NO: 2 и 4); и

(iii) лекарственный продукт gp140 содержит гликопротеин 140 ВИЧ-1 субтипа С (рекомбинантный примерный gp140, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5), получали с помощью трансформированной клеточной линии PER.C6™, сконструированной для продуцирования gp140. В этом исследовании, лекарственный продукт gp140 дозировали с фосфатом алюминия в качестве адьюванта, и дозировали

ванный лекарственный продукт gp140 обозначали просто "gp140 DP".

Цели и задачи.

Основные задачи исследования включают: (1) оценку безопасности/переносимости различных схем прайм-буст, содержащих компоненты Ad26mos, MVAmos, и/или gp140 DP; и (2) сравнение ответов ВИЧ Env-связывающих антител между различными схемами вакцин.

Вторая цель исследования включает оценку другого связывания антитела, эффекторной функции антитела и характеристики антител и клеточных ответов.

Изыскательские задачи исследования включают: (1) изучение иммунных ответов на различные схемы вакцин в секретах слизистой оболочки в подгруппе объектов; (2) изучение профилей экспрессии генов между различными схемами вакцины; и (3) изучение нейтрализующих антител против векторов Ad26.

Вакцинация и дизайн эксперимента.

Исследование включает в себя период вакцинации 48 недель, в течение которого объектов вакцинируют исходно (неделя 0), на неделе 12 и неделе 24, вакцинируют бустерной дозой на 48 неделе, и в последующий период 48 недель до последнего визита на 96 неделе. Вакцинации вводили, как показано в табл. 1В, и проводили забор крови в конкретные посещения клиники для оценки иммунных ответов.

Долгосрочный период наблюдения (приблизительно 2 года после 96 недели) будет продолжаться для объектов, рандомизированных по отношению к схеме, которые впоследствии выбирали для будущих исследований, на основе анализа данных 28-й недели. Если данные недели 28 являются недостаточными, то при выборе схемы принимаются во внимание данные недели 52. В том случае, если не может быть принято четкое решение, то этот расширенный период наблюдения может включать объектов из более чем одной группы с целью оценки продолжительности иммунных ответов. Концом исследования является последнее посещение последнего объекта.

Таблица 1В. Схемы вакцин, тестируемые на людях

Группа	N	Неделя 0 (исходная точка)	Неделя 12	Неделя 24	Неделя 48 бустер
Группа 1	50	Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub> +gp140 DP (250 мкг белок/ад.* )	Ad26 <sub>mos</sub> +gp140 DP (250 мкг белок/ад.* )
Группа 2	50	Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub> +gp140 DP (50 мкг белок/ад.* )	Ad26 <sub>mos</sub> +gp140 DP (50 мкг белок/ад.* )
Группа 3	50	Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub>
Группа 4	50	Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub>	MVA <sub>mos</sub> +gp140 DP (250 мкг белок/ад.* )	MVA <sub>mos</sub> +gp140 DP (250 мкг белок/ад.* )
Группа 5	50	Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub>	MVA <sub>mos</sub> +gp140 DP (50 мкг белок/ад.* )	MVA <sub>mos</sub> +gp140 DP (50 мкг белок/ад.* )
Группа 6	50	Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub>	MVA <sub>mos</sub>	MVA <sub>mos</sub>
Группа 7	50	Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub>	gp140 DP (250 мкг белок/ад.* )	gp140 DP (250 мкг белок/ад.* )
Группа 8	50	Плацебо	Плацебо	Плацебо	Плацебо

\*ад. представляет собой AdjuPhos™ (стерилизованная влажная гелевая суспензия фосфата алюминия, использовали в качестве адьюванта для gp140, содержание алюминия составило 0,425 мг/доза 0,5 мл; 50 мкг (низкая доза) и 250 мкг (высокая доза) в пересчете на суммарное содержание белка gp140.

Дозировка и введение.

Объекты получали дозы исследуемой вакцины в четыре момента времени согласно рандомизации, на 1-й день недели 0, на 12-й неделе и на 24-й неделе, с бустерным введением на 48 неделе путем внутримышечной инъекции в дельтовидную мышцу. Для посещения с целью только одной инъекции (т.е. на неделях 0 и 12), любая дельтовидная мышца может быть использована для инъекции. Когда за одно по-

сечение делают две инъекции исследуемых вакцин (т.е. в недели 24 и 48), то для каждой инъекции используют различные дельтовидные мышцы (за исключением случаев, разрешенных по медицинским показаниям). Исследуемые вакцины с вводимыми дозами представлены ниже:

(i) Ad26mos (Ad26.Mos1Env+Ad26.Mos1Gag-Pol+Ad26.Mos2Gag-Pol):

суммарная доза составляет  $5 \times 10^{10}$  вирусных частиц (вч) на 0,5 мл инъекции

(ii) MVAmos (MVA-Mosaic1+MVA-Mosaic2):

суммарная доза составляет  $10^8$  бляшкообразующих единиц (БОЕ) на 0,5 мл инъекции

(iii) gp140 DP:

низкая доза: gp140 DP с 50 мкг суммарного белка, смешанного с адьювантом фосфатом алюминия (0,425 мг алюминия) в аптеке, на 0,5 мл инъекции

высокая доза: gp140 DP с 250 мкг суммарного белка, смешанного с адьювантом фосфатом алюминия (0,425 мг алюминия) в аптеке, за 0,5 мл инъекции

(iv) плацебо: 0,9% солевой раствор, 0,5 мл инъекции.

Оценки иммуногенности.

Анализы проводили для оценки гуморального иммунного ответа, включающего, но не ограниченного этим: анализ антитела, связывающего ENV-специфическую сыворотку, pAb анализы, и анализ антитело-зависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), а также картирование эпитопов (см. табл. 2).

Таблица 2. Анализы гуморального иммунного ответа

Цель/результат	Система	Анализ/Метод	Считывание данных	Момент времени
Первичные	Сыворотка	Env-связывающее антитело (ИФА)	Титр или % отвечающих (субтип С) и спектр действия (субтип А, В, С)	Базовый уровень 1 м пост-вак. 1 0,5, 1 м пост-вак. 2-4 3, 6 м пост-вак. 4
Вторичные	Сыворотка	HIV-нейтрализующее антитело	Уровень 1 и Уровень 2 <sup>a</sup> pAb: GMT для каждого изолята, % отвечающих на каждый изолят Спектр действия: # нейтрализованные изоляты	Как выше
Вторичные	Сыворотка	gp120-связывающее антитело	анти-gp120 титр (субтип А, В, С)	Как выше
Вторичные	Сыворотка	ADCP	% фагоцитоза	Как выше
Вторичные	Сыворотка	Изотипирование Env-связывающего антитела (ИФА)	изотипирование (субтип С) (IgA, IgG1, IgG2, IgG3)	Как выше
Исследовательские	Сыворотка	Картирование эпитопов	Целевые эпитопы и разнообразие (включая V2)	1 м пост-вак. 1-4 в вак. 2-4
Исследовательские	Сыворотка	Ad26-нейтрализующие антитела	Титры Ad26-нейтрализующих антител	1 м пост-вак. 1-4 3, 7.5, 12 м пост-вак. 4 в вак. 1-4

ADCP - антитело-зависимый клеточный фагоцитоз;

ИФА - иммуноферментный анализ;

GMT - среднее геометрическое значение титра;

Ig - иммуноглобулин;

м - месяц;

pAb - нейтрализующее антитело;

вак. - вакцинация;

<sup>a</sup> классификация ВИЧ-1 вирусов в соответствии с чувствительностью к опосредованной антителами нейтрализации: очень высокая (уровень 1A), выше среднего (уровень 1B), умеренная (уровень 2) или низкая (уровень 3)<sup>1</sup>. Уровень 2 будет оцениваться, только если уровень 1 показывает положительные результаты.

Проводили анализы для оценки клеточного иммунного ответа, включая, но не ограничиваясь этим: ELISPOT, внутриклеточное окрашивание цитокинов и многопараметрическую проточную цитометрию (табл. 3).

Таблица 3. Анализы Т-клеточного иммунного ответа

Цель/Результат	Система	Анализ/Метод	Считывание данных	Момент времени
Вторичные	РВМС	ELISPOT	Спектр действия и глубина: # пептидов, % отвечающих, Медианный ответ	Базовый уровень 0,5, 1 м пост-вак. 3 и 4
Исследовательские	РВМС	Внутриклеточное окрашивание цитокинов	% CD4 и CD8+ Т-клеток, продуцирующих IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$	Базовый уровень 1 м пост-вак. 1 0,5, 1 м пост-вак. 2-4 3, 7,5 м пост-вак. 4
Исследовательские	РВМС	Мультипараметрическая проточная цитометрия	Характеризация развития Т-клеток памяти с упором на фолликулярные хелперные Т-клетки	Базовый уровень 1 м пост-вак. 1 0,5, 1 м пост-вак. 2-4 3, 7,5 м пост-вак. 4
Исследовательские	РВМС	Анализ экспрессии генов	Регуляция генов (кластеры), которые прогнозируют специфический иммунный ответ и HLA типирование	Базовый уровень 1 м пост-вак. 1 0,5, 1 м пост-вак. 2-4 3, 7,5 м пост-вак. 4

ELISPOT - анализ иммуноферментных пятен;

HLA - антиген лейкоцитов человека;

IFN $\gamma$  - интерферон  $\gamma$ ;

IL-2 - интерлейкин 2;

м - месяц;

РВМС - мононуклеары периферической крови;

TNF- $\alpha$  - фактор некроза опухолей альфа;

вак. - вакцинация.

Примечание: HLA тестировали только один раз (с использованием образца крови базового уровня).

Пример 3. Дальнейшие исследования схем вакцин против ВИЧ у людей.

Дальнейшие клинические исследования на людях проводили с целью оценки безопасности/переносимости и иммуногенности различных схем вакцин с векторами гAd26, экспрессирующими мозаичные антигены ВИЧ и выделенный тримерный белок gp140 субтипа С у здоровых ВИЧ-неинфицированных объектов. В частности, тестировали более короткие схемы лечения и схемы с меньшим количеством дозирования по сравнению с исследованием, описанным в примере 2. Оптимизация схемы вакцины может повысить соблюдение полной схемы и/или быть проще в использовании и проще во введении.

Вакцинация и дизайн эксперимента.

Проводили одноцентровое, рандомизированное, в параллельных группах, плацебо-контролируемое, двойное слепое клиническое исследование фазы 1 у здоровых ВИЧ-неинфицированных взрослых мужчин и женщин в возрасте от 18 до 50 лет. Целевая группа из 36 объектов-людей - участвующие в данном исследовании. Объектов разделили на три группы (группы от 1 до 3) по 12 объектов, рандомизированных в каждой группе. Объекты в каждой группе дополнительно рандомизировали на две подгруппы: подгруппа А (10 объектов) и подгруппа В (2 объектов). Объекты в подгруппе А получали исследуемую вакцину, а объекты в подгруппе В получали плацебо. Объекты включали в исследование независимо от их исходной Ad26 серопозитивности.

Исследование включало максимальный период вакцинации 48 недель, и последующий период после вакцинации до 72 недели. Объекты получали исследуемые вакцины или плацебо в соответствии со схемами в табл. 4 ниже. См. пример 2 для описания вакцинных композиций, используемых в исследовании.

Таблица 4. Схема для введения исследуемых вакцин в исследовании

Группа	N	Неделя 0	Неделя 8	Неделя 12	Неделя 24	Неделя 48
1А	1 0	Ad26 <sub>mos</sub>		Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub> +gp 140 DP (250 мкг белок/ад. )	Ad26 <sub>mos</sub> +g p140 DP (250 мкг белок/ад. )
1В	2	Плацебо		Плацебо	Плацебо + Плацебо	Плацебо + Плацебо
2А	1 0	Ad26 <sub>mos</sub> +gp 140 DP (250 мкг белок/ад. )		Ad26 <sub>mos</sub> +gp 140 DP (250 мкг белок/ад. )	Ad26 <sub>mos</sub> +gp 140 DP (250 мкг белок/ад. )	
2В	2	Плацебо+П лацебо		Плацебо + Плацебо	Плацебо + Плацебо	
3А	1 0	Ad26 <sub>mos</sub>	Ad26 <sub>mos</sub> +gp 140 DP (250 мкг белок/ад. )		Ad26 <sub>mos</sub> +gp 140 DP (250 мкг белок/ад. )	
3В	2	Плацебо	Плацебо + Плацебо		Плацебо + Плацебо	

Группа 1 представляет собой схему "базовый случай", которая позволяет совмещать данные из этого исследования с исследованием в примере 2. Объектам в группе 1 вводили четыре вакцинации на неделях 0, 12, 24 и 48, что представляет собой ту же схему дозирования, как для объектов в группе 1 исследования в примере 2 (см. табл. 1В в примере 2). Группы 2 и 3 получали три вакцинации в течение 24 недель (группа 2: недели 0, 12 и 24; группа 3: недели 0, 8 и 24). Образцы крови отбирали в конкретные посещения клиники для оценки иммунных ответов.

Более конкретно, группа 2 исследовала более короткую, более удобную схему за счет устранения необходимости для объекта возвращаться в клинику для последней буст-вакцинации на 48 неделе, в отличие от "базового случая".

Группа 3 исследовала способность векторов гAd26 с помощью прайм-вакцинации вызывать качественно аналогичный ответ как при полной схеме, достигая при этом уровня иммуногенности, который превосходит уровень схемы "базового случая" после 24-й недели благодаря дополнительной дозе gp140 DP при второй вакцинации.

Промежуточный анализ (слепой) осуществляли один раз все объекты, завершившие посещением на 28-й неделе или прекратившие участие ранее. Первичный анализ (раскрытый слепой) осуществляли один раз все объекты, завершившие посещение на 52-й неделе или прекратившие участие ранее. Окончательный анализ осуществляли один раз все объекты, завершившие свое последнее посещение на 72 неделе.

Пример 4. Дополнительные исследования схем вакцины против ВИЧ у людей.

Дополнительные клинические исследования на людях также проводили с целью оценки безопасности/переносимости и иммуногенности различных вакцинных схем с векторами MVA и тримерным белком gp140 субтипа С у здоровых ВИЧ-неинфицированных объектов, где тестировали более короткие схемы дозирования и схемы, содержащие меньшее количество доз, по сравнению с исследованием в примере 2. Объекты получали исследуемые вакцины или плацебо в соответствии со схемами в табл. 5 ниже. Вакцинные композиции, используемые в этом исследовании, такие как описано в примере 2. Участников исследования рандомизировали, как описано выше для исследования в примере 3.

Таблица 5. Схема для введения исследуемых вакцин в данном исследовании

Группа	Неделя 0	Неделя 8	Неделя 12	Неделя 24	Неделя 48
1А	Ad26 <sub>mos</sub>		Ad26 <sub>mos</sub>	MVA <sub>mos</sub> +gp140 DP (250 мкг белок/ад.)	MVA <sub>mos</sub> +gp140 DP (250 мкг белок/ад.)
1В	Плацебо		Плацебо	Плацебо + Плацебо	Плацебо + Плацебо
2А	Ad26 <sub>mos</sub> +gp140 DP (250 мкг/adj)		MVA <sub>mos</sub> +gp140 DP (250 мкг белок/ад.)	MVA <sub>mos</sub> +gp140 DP (250 мкг белок/ад.)	
2В	Плацебо + Плацебо		Плацебо + Плацебо	Плацебо + Плацебо	
3А	Ad26 <sub>mos</sub>	MVA <sub>mos</sub> +gp140 DP (250 мкг белок/ад.)		MVA <sub>mos</sub> +gp140 DP (250 мкг белок/ад.)	
3В	Плацебо	Плацебо + Плацебо		Плацебо + Плацебо	

Первая группа (группа 1) снова представляла схему "базовый случай", которая позволяет совмещать данные из этого исследования с исследованием в примере 2. Объектам вводили четыре вакцинации на неделях 0, 12, 24 и 48, что представляет собой такую же схему дозирования, как у объектов в группе 4 исследования в примере 2 (см. табл. 1В в примере 2). Другие группы (группы 2 и 3) получали более короткие схемы и их вакцинировали на в 0, 8 или 12 и 24-й неделе. Прайминг в данном исследовании осуществляли с использованием векторов Ad26 и бустинг - с использованием векторов MVA. Возможные преимущества этих схем включают большее удобство с более короткой продолжительностью (в целом 24 недели) по сравнению со схемой в группе 1 (в целом 48 недель). Образцы крови отбирали в конкретные посещения клиники для оценки иммунного ответа.

Понятно, что примеры и воплощения, описанные в настоящем документе, приведены только в иллюстративных целях и что могут быть сделаны изменения в воплощениях, описанных выше, не выходя за рамки их широкой изобретательской концепции. Поэтому понятно, что изобретение не ограничивается конкретными раскрытыми воплощениями, но оно предназначено для охвата модификаций в пределах сущности и объема изобретения, как это определено в прилагаемой формуле изобретения.

**Ссылки**

1. Gurwith, M., et al., Safety and immunogenicity of an oral, replicating adenovirus serotype 4 vector vaccine for H5N1 influenza: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 study. *Lancet Infect Dis*, 2013. 13(3): p. 238-50.
2. Centers for Disease, Control, and Prevention, Vital signs: HIV prevention through care and treatment--United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2011. 60(47): p. 1618-23.
3. Centlivre, M., et al., In HIV-1 pathogenesis the die is cast during primary infection. *AIDS*, 2007. 21(1): p. 1-11.
4. Wawer, M.J., et al., Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda. *J Infect Dis*, 2005. 191(9): p. 1403-9.
5. Flynn, N.M., et al., Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis*, 2005. 191(5): p. 654-65.
6. Pitisuttithum, P., et al., Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J Infect Dis*, 2006. 194(12): p. 1661-71.
7. Gray, G.E., et al., Safety and efficacy of the HVTN 503/Phambili study of a clade-B-based HIV-1 vaccine in South Africa: a double-blind, randomised, placebo-controlled test-of-concept phase 2b study. *Lancet Infect Dis*, 2011. 11(7): p. 507-

15.

8. Buchbinder, S.P., et al., Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet*, 2008. 372(9653): p. 1881-93.

9. Rerks-Ngarm, S., et al., Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med*, 2009. 361(23): p. 2209-20.

10. McElrath, M.J., et al., HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *Lancet*, 2008. 372(9653): p. 1894-905.

11. Abbink, P., et al., Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. *J Virol*, 2007. 81(9): p. 4654-63.

12. Vogels, R., et al., Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. *J Virol*, 2003. 77(15): p. 8263-71.

13. Farina, S.F., et al., Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. *J Virol*, 2001. 75(23): p. 11603-13.

14. Barouch, D.H., et al., International seroepidemiology of adenovirus serotypes 5, 26, 35, and 48 in pediatric and adult populations. *Vaccine*, 2011. 29: p. 5203-5209.

15. Mast, T.C., et al., International epidemiology of human pre-existing adenovirus (Ad) type-5, type-6, type-26 and type-36 neutralizing antibodies: correlates of high Ad5 titers and implications for potential HIV vaccine trials. *Vaccine*, 2010. 28(4): p. 950-7.

16. Chen, H., et al., Adenovirus-based vaccines: comparison of vectors from three species of adenoviridae. *J Virol*, 2010. 84(20): p. 10522-32.

17. Thorner, A.R., et al., Age dependence of adenovirus-specific neutralizing antibody titers in individuals from sub-Saharan Africa. *J Clin Microbiol*, 2006. 44(10): p. 3781-3.

18. Sprangers, M.C., et al., Quantifying adenovirus-neutralizing antibodies by luciferase transgene detection: addressing preexisting immunity to vaccine and gene therapy vectors. *J Clin Microbiol*, 2003. 41(11): p. 5046-52.
19. Waddington, S.N., et al., Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell*, 2008. 132(3): p. 397-409.
20. Liu, J., et al., Magnitude and phenotype of cellular immune responses elicited by recombinant adenovirus vectors and heterologous prime-boost regimens in rhesus monkeys. *J Virol*, 2008. 82(10): p. 4844-52.
21. Liu, J., et al., Immune control of an SIV challenge by a T-cell-based vaccine in rhesus monkeys. *Nature*, 2009. 457(7225): p. 87-91.
22. Lore, K., et al., Myeloid and plasmacytoid dendritic cells are susceptible to recombinant adenovirus vectors and stimulate polyfunctional memory T cell responses. *J Immunol*, 2007. 179(3): p. 1721-9.
23. unpublished, Barouch. et al.
24. Barouch et al.,. in *AIDS Vaccine*. 2009. Paris, France.
25. Kuschner, R.A., et al., A phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of the live, oral adenovirus type 4 and type 7 vaccine, in U.S. military recruits. *Vaccine*, 2013. 31(28): p. 2963-71.
26. Masopust, D. and L.J. Picker, Hidden memories: frontline memory T cells and early pathogen interception. *J Immunol*, 2012. 188(12): p. 5811-7.
27. Bell, J.A., et al., Illness and microbial experiences of nursery children at junior village. *American Journal of Hygiene*, 1961. 74: p. 267-292.
28. Rhee, E.G. and D.H. Barouch, Adenoviruses, in *Principles and Practice of Infectious Diseases*, G.L. Mandell, J.E. Bennett, and R. Dolin, Editors. 2010, Elsevier: Philadelphia, PA.
29. Brandt, C.D., et al., Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. I. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and

illness syndrome. *Am J Epidemiol*, 1969. 90(6): p. 484-500.

30. Fox, J.P., et al., The virus watch program: a continuing surveillance of viral infections in metropolitan New York families. VI. Observations of adenovirus infections: virus excretion patterns, antibody response, efficiency of surveillance, patterns of infections, and relation to illness. *Am J Epidemiol*, 1969. 89(1): p. 25-50.

31. Fox, J.P., C.E. Hall, and M.K. Cooney, The Seattle Virus Watch. VII. Observations of adenovirus infections. *Am J Epidemiol*, 1977. 105(4): p. 362-86.

32. Noel, J., et al., Identification of adenoviruses in faeces from patients with diarrhoea at the Hospitals for Sick Children, London, 1989-1992. *J Med Virol*, 1994. 43(1): p. 84-90.

33. Faden, H., et al., Pediatric adenovirus infection: relationship of clinical spectrum, seasonal distribution, and serotype. *Clin Pediatr (Phila)*, 2011. 50(6): p. 483-7.

34. Abbas, K.Z., et al., Temporal changes in respiratory adenovirus serotypes circulating in the greater Toronto area, Ontario, during December 2008 to April 2010. *Virol J*, 2013. 10: p. 15.

35. Diarrhea: Why children are still dying and what can be done, 2009, The United Nations Children's Fund (UNICEF)/World Health Organization (WHO): New York, NY.

36. Ramani, S. and G. Kang, Viruses causing childhood diarrhoea in the developing world. *Curr Opin Infect Dis*, 2009. 22(5): p. 477-82.

37. Kotloff, K.L., et al., Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*, 2013. 382(9888): p. 209-22.

38. Magwalivha, M., et al., High prevalence of species D human adenoviruses in fecal specimens from Urban Kenyan children with diarrhea. *J Med Virol*, 2010. 82(1): p. 77-84.

39. Liu, L.Y., et al., [Investigation of adenovirus infection in hospitalized children with diarrhea during 2010 in

Beijing, China]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 2012. 50(6): p. 450-4.

40. Ouyang, Y., et al., Etiology and epidemiology of viral diarrhea in children under the age of five hospitalized in Tianjin, China. *Arch Virol*, 2012. 157(5): p. 881-7.

41. Lee, J.I., et al., Detection and molecular characterization of adenoviruses in Korean children hospitalized with acute gastroenteritis. *Microbiol Immunol*, 2012. 56(8): p. 523-8.

42. Espinola, E.E., et al., Genetic diversity of human adenovirus in hospitalized children with severe acute lower respiratory infections in Paraguay. *J Clin Virol*, 2012. 53(4): p. 367-9.

43. Mast, T.C., et al., International epidemiology of human pre-existing adenovirus (Ad) type-5, type-6, type-26 and type-36 neutralizing antibodies: correlates of high Ad5 titers and implications for potential HIV vaccine trials. *Vaccine*, 2010. 28: p. 950-957.

44. Kasel, J.A., et al., Conjunctivitis and enteric infection with adenovirus types 26 and 27: responses to primary, secondary and reciprocal cross-challenges. *Am J Hyg*, 1963. 77: p. 265-82.

45. Hierholzer, J.C., et al., Adenoviruses from patients with AIDS: a plethora of serotypes and a description of five new serotypes of subgenus D (types 43-47). *J Infect Dis*, 1988. 158(4): p. 804-13.

46. Khoo, S.H., et al., Adenovirus infections in human immunodeficiency virus-positive patients: clinical features and molecular epidemiology. *J Infect Dis*, 1995. 172(3): p. 629-37.

47. Curlin, M.E., et al., Frequent detection of human adenovirus from the lower gastrointestinal tract in men who have sex with men. *PLoS One*, 2010. 5(6): p. e11321.

48. Dubberke, E.R., et al., Acute meningoencephalitis caused by adenovirus serotype 26. *J Neurovirol*, 2006. 12(3): p. 235-40.

49. Koneru, B., et al., Adenoviral infections in pediatric liver transplant recipients. *JAMA*, 1987. 258(4): p. 489-92.

50. Venard, V., et al., Genotyping of adenoviruses isolated in an outbreak in a bone marrow transplant unit shows that diverse strains are involved. *J Hosp Infect*, 2000. 44(1): p. 71-4.
51. Al Qurashi, Y.M., M. Guiver, and R.J. Cooper, Sequence typing of adenovirus from samples from hematological stem cell transplant recipients. *J Med Virol*, 2011. 83(11): p. 1951-8.
52. Janes, H., et al., MRKAd5 HIV-1 Gag/Pol/Nef vaccine-induced T-cell responses inadequately predict distance of breakthrough HIV-1 sequences to the vaccine or viral load. *PLoS One*, 2012. 7(8): p. e43396.
53. Fischer, W., et al., Polyvalent vaccines for optimal coverage of potential T-cell epitopes in global HIV-1 variants. *Nat Med*, 2007. 13(1): p. 100-6.
54. Barouch, D.H., et al., Mosaic HIV-1 vaccines expand the breadth and depth of cellular immune responses in rhesus monkeys. *Nat Med*, 2010. 16(3): p. 319-23.
55. Santra, S., et al., Mosaic vaccines elicit CD8+ T lymphocyte responses that confer enhanced immune coverage of diverse HIV strains in monkeys. *Nat Med*, 2010. 16(3): p. 324-8.
56. Li, Q., et al., Visualizing antigen-specific and infected cells in situ predicts outcomes in early viral infection. *Science*, 2009. 323(5922): p. 1726-9.
57. Baden, L.R., et al., First-in-human evaluation of the safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 Env vaccine (IPCAVD 001). *J Infect Dis*, 2013. 207(2): p. 240-7.
58. Barouch, D.H., et al., Characterization of humoral and cellular immune responses elicited by a recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 Env vaccine in healthy adults (IPCAVD 001). *J Infect Dis*, 2013. 207(2): p. 248-56.
59. WO 2010/042942 entitled «Biochemically stabilized HIV-1 ENV Trimer Vaccine»
60. Kovacs et al, «HIV-1 envelope trimer elicits more potent neutralizing antibody responses than monomeric gp120,» *PNAS* 2012, 109(30):12111-6.

61. Havenga, et al., (2006) *J Gen Virol* 87(Pt 8): 2135-43.
62. Jin, et al., *Vaccine* 28(27): 4369-75.
63. de Gruijl, et al., (2006) *J Immunol* 177(4): 2208-15.
64. Haslett et al. *Journal of Infectious Diseases* 181: 1264-72 (2000), page 1268.
65. Barouch et al., *Cell* 155:1-9, 2013.
66. Yang et al. (2002) *J. Virol.* 76:4634.
67. Chen et al. (2004) *J. Virol.* 78:4508.
68. Nkolola et al., 2010. Breadth of Neutralizing Antibodies Elicited by Stable, Homogeneous Clade A and Clade C HIV-1 gp140 Envelope Trimers in Guinea Pigs. *J. Virology* 84 (7): 3270-3279.
69. Cohen et al, 2002, *J Gen Virol* 83: 151-55.
70. Kobinger et al, 2006, *Virology* 346: 394-401.
71. Tatsis et al., 2007, *Molecular Therapy* 15: 608-17.
72. Bangari and Mittal, 2006, *Vaccine* 24: 849-62.
73. Lasaro and Ertl, 2009, *Mol Ther* 17: 1333-39.
74. Mayr et al. (1975), *Infection* 3, 6-14.
75. Mayr, A. & Dannor, K. (1978), *Dev. Biol. Stand.* 41: 225-234.
76. Mayr et al. (1978), *Zentralbl. Bacteriol. (B)* 167:375-390.
77. Stickl (1974), *Prev. Med.* 3: 97-101.
78. Stickl and Hochstein-Mintzel (1971), *Munch. Med. Wochenschr.* 113: 1149-1153.
79. Blanchard et al. (1998), *J. Gen. Virol.* 79:1159-1167.
80. Carroll & Moss (1997), *Virology* 238:198-211.
81. Ambrosini et al. (1999), *J. Neurosci. Res.* 55: 569.
82. Boukamp et al (1988), *J. Cell Biol.* 106: 761-771.
83. J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

## Список последовательностей

<110> БЕТ ИЗРЕЙЭЛ ДИКОНИСС МЕДИКАЛ СЕНТЕР, ИНК.  
ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД ПРЕВЕНШН Б.В.

<120> Способы и композиции для индукции защитного иммунитета против  
инфекции вируса иммунодефицита человека

<130> 688097-53WO (CRU5171WOPCT/0246 WO 00 ORD)

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 685  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Последовательность мозаичного антигена Mos1.Env

<400> 1

Met Arg Val Thr Gly Ile Arg Lys Asn Tyr Gln His Leu Trp Arg Trp  
1. 5 10 15

Gly Thr Met Leu Leu Gly Ile Leu Met Ile Cys Ser Ala Ala Gly Lys  
20 25 30

Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr  
35 40 45

Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val  
50 55 60

His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro  
65 70 75 80

Gln Glu Val Val Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys  
85 90 95

Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp  
100 105 110

Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu  
115 120 125

Asn Cys Thr Asp Asp Val Arg Asn Val Thr Asn Asn Ala Thr Asn Thr



037583

Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Ser Phe Asn Cys Gly Gly  
 370 375 380

Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Ser Thr Lys Leu Phe Asn Ser Thr Trp Thr  
 385 390 395 400

Trp Asn Asn Ser Thr Trp Asn Asn Thr Lys Arg Ser Asn Asp Thr Glu  
 405 410 415

Glu His Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp  
 420 425 430

Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Arg Gly Gln Ile  
 435 440 445

Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly  
 450 455 460

Asn Asp Thr Ser Gly Thr Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met  
 465 470 475 480

Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile  
 485 490 495

Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln  
 500 505 510

Ser Glu Lys Ser Ala Val Gly Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Phe Leu  
 515 520 525

Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val  
 530 535 540

Gln Ala Arg Leu Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu  
 545 550 555 560

Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp  
 565 570 575

Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu  
 580 585 590

037583

Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile  
595 600 605

Cys Thr Thr Thr Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu  
610 615 620

Asp Lys Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Glu Arg Glu Ile  
625 630 635 640

Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile Tyr Thr Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn  
645 650 655

Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala  
660 665 670

Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Ser Asn Trp Leu Trp  
675 680 685

<210> 2  
<211> 684  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Последовательность мозаичного антигена Mos2.Env

<400> 2

Met Arg Val Arg Gly Ile Gln Arg Asn Trp Pro Gln Trp Trp Ile Trp  
1. 5 10 15

Gly Ile Leu Gly Phe Trp Met Ile Ile Ile Cys Arg Val Met Gly Asn  
20 25 30

Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Lys  
35 40 45

Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Glu Lys Glu Val  
50 55 60

His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro  
65 70 75 80

Gln Glu Met Val Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys  
85 90 95

037583

Asn Asp Met Val Asp Gln Met His Glu Asp Ile Ile Arg Leu Trp Asp  
100 105 110

Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu  
115 120 125

Glu Cys Arg Asn Val Arg Asn Val Ser Ser Asn Gly Thr Tyr Asn Ile  
130 135 140

Ile His Asn Glu Thr Tyr Lys Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ala  
145 150 155 160

Thr Thr Val Val Glu Asp Arg Lys Gln Lys Val His Ala Leu Phe Tyr  
165 170 175

Arg Leu Asp Ile Val Pro Leu Asp Glu Asn Asn Ser Ser Glu Lys Ser  
180 185 190

Ser Glu Asn Ser Ser Glu Tyr Tyr Arg Leu Ile Asn Cys Asn Thr Ser  
195 200 205

Ala Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Asp Pro Ile Pro Ile  
210 215 220

His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Tyr Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys  
225 230 235 240

Thr Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Asn Asn Val Ser Thr Val Gln Cys  
245 250 255

Thr His Gly Ile Lys Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly  
260 265 270

Ser Leu Ala Glu Glu Glu Ile Ile Ile Arg Ser Glu Asn Leu Thr Asn  
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val His Leu Asn Glu Thr Val Asn Ile Thr  
290 295 300

Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro  
305 310 315 320

037583

Gly Gln Thr Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln  
 325 330 335

Ala His Cys Asn Leu Ser Arg Asp Gly Trp Asn Lys Thr Leu Gln Gly  
 340 345 350

Val Lys Lys Lys Leu Ala Glu His Phe Pro Asn Lys Thr Ile Asn Phe  
 355 360 365

Thr Ser Ser Ser Gly Gly Asp Leu Glu Ile Thr Thr His Ser Phe Asn  
 370 375 380

Cys Arg Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser Gly Leu Phe Asn Gly  
 385 390 395 400

Thr Tyr Met Pro Asn Gly Thr Asn Ser Asn Ser Ser Ser Asn Ile Thr  
 405 410 415

Ileu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly  
 420 425 430

Arg Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ala Gly Asn Ile Thr Cys Arg Ser  
 435 440 445

Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Ser Asn Asn Gly  
 450 455 460

Val Pro Asn Asp Thr Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg  
 465 470 475 480

Asn Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Glu Val Lys  
 485 490 495

Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Glu Ala Lys Arg Arg Val Val Glu Ser  
 500 505 510

Glu Lys Ser Ala Val Gly Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Ile Leu Gly  
 515 520 525

Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Ile Thr Leu Thr Val Gln  
 530 535 540

037583

Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Ser Asn Leu Leu  
545 550 555 560

Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Met Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly  
565 570 575

Ile Lys Gln Leu Gln Thr Arg Val Leu Ala Ile Glu Arg Tyr Leu Gln  
580 585 590

Asp Gln Gln Leu Leu Gly Leu Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys  
595 600 605

Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Thr Ser Trp Ser Asn Lys Ser Gln Thr  
610 615 620

Asp Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Met Gln Trp Asp Lys Glu Ile Gly  
625 630 635 640

Asn Tyr Thr Gly Glu Ile Tyr Arg Leu Leu Glu Glu Ser Gln Asn Gln  
645 650 655

Gln Glu Lys Asn Glu Lys Asp Leu Leu Ala Leu Asp Ser Trp Lys Asn  
660 665 670

Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp  
675 680

<210> 3

<211> 1350

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность мозаичного антигена Mos1.Gag-Pol

<400> 3

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp  
1. 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Leu Lys  
20 25 30

His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro  
35 40 45

037583

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu  
50 55 60

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn  
65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp  
85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Glu Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys  
100 105 110

Lys Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly Asn Ser Ser Gln Val  
115 120 125

Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His  
130 135 140

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu  
145 150 155 160

Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser  
165 170 175

Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly  
180 185 190

Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu  
195 200 205

Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala  
210 215 220

Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr  
225 230 235 240

Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile  
245 250 255

Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys  
260 265 270

037583

Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Val Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly  
 275 280 285

Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu  
 290 295 300

Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr  
 305 310 315 320

Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala  
 325 330 335

Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly  
 340 345 350

Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser  
 355 360 365

Gln Val Thr Asn Ser Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg  
 370 375 380

Asn Gln Arg Lys Thr Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His  
 385 390 395 400

Ile Ala Lys Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys  
 405 410 415

Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn  
 420 425 430

Phe Leu Gly Lys Ile Trp Pro Ser Asn Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe  
 435 440 445

Leu Gln Asn Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu Ser Phe Arg  
 450 455 460

Phe Gly Glu Glu Thr Thr Thr Pro Ser Gln Lys Gln Glu Pro Ile Asp  
 465 470 475 480

Lys Glu Met Tyr Pro Leu Ala Ser Leu Lys Ser Leu Phe Gly Asn Asp  
 485 490 495

Pro Ser Ser Gln Met Ala Pro Ile Ser Pro Ile Glu Thr Val Pro Val

037583

500 505 510  
 Lys Leu Lys Pro Gly Met Asp Gly Pro Arg Val Lys Gln Trp Pro Leu  
 515 520 525  
 Thr Glu Glu Lys Ile Lys Ala Leu Thr Ala Ile Cys Glu Glu Met Glu  
 530 535 540  
 Lys Glu Gly Lys Ile Thr Lys Ile Gly Pro Glu Asn Pro Tyr Asn Thr  
 545 550 555 560  
 Pro Val Phe Ala Ile Lys Lys Lys Asp Ser Thr Lys Trp Arg Lys Leu  
 565 570 575  
 Val Asp Phe Arg Glu Leu Asn Lys Arg Thr Gln Asp Phe Trp Glu Val  
 580 585 590  
 Gln Leu Gly Ile Pro His Pro Ala Gly Leu Lys Lys Lys Lys Ser Val  
 595 600 605  
 Thr Val Leu Ala Val Gly Asp Ala Tyr Phe Ser Val Pro Leu Asp Glu  
 610 615 620  
 Gly Phe Arg Lys Tyr Thr Ala Phe Thr Ile Pro Ser Thr Asn Asn Glu  
 625 630 635 640  
 Thr Pro Gly Ile Arg Tyr Gln Tyr Asn Val Leu Pro Gln Gly Trp Lys  
 645 650 655  
 Gly Ser Pro Ala Ile Phe Gln Cys Ser Met Thr Arg Ile Leu Glu Pro  
 660 665 670  
 Phe Arg Ala Lys Asn Pro Glu Ile Val Ile Tyr Gln Tyr Met Ala Ala  
 675 680 685  
 Leu Tyr Val Gly Ser Asp Leu Glu Ile Gly Gln His Arg Ala Lys Ile  
 690 695 700  
 Glu Glu Leu Arg Glu His Leu Leu Lys Trp Gly Phe Thr Thr Pro Asp  
 705 710 715 720  
 Lys Lys His Gln Lys Glu Pro Pro Phe Leu Trp Met Gly Tyr Glu Leu  
 725 730 735

037583

His Pro Asp Lys Trp Thr Val Gln Pro Ile Gln Leu Pro Glu Lys Asp  
740 745 750

Ser Trp Thr Val Asn Asp Ile Gln Lys Leu Val Gly Lys Leu Asn Trp  
755 760 765

Ala Ser Gln Ile Tyr Pro Gly Ile Lys Val Arg Gln Leu Cys Lys Leu  
770 775 780

Leu Arg Gly Ala Lys Ala Leu Thr Asp Ile Val Pro Leu Thr Glu Glu  
785 790 795 800

Ala Glu Leu Glu Leu Ala Glu Asn Arg Glu Ile Leu Lys Glu Pro Val  
805 810 815

His Gly Val Tyr Tyr Asp Pro Ser Lys Asp Leu Ile Ala Glu Ile Gln  
820 825 830

Lys Gln Gly His Asp Gln Trp Thr Tyr Gln Ile Tyr Gln Glu Pro Phe  
835 840 845

Lys Asn Leu Lys Thr Gly Lys Tyr Ala Lys Met Arg Thr Ala His Thr  
850 855 860

Asn Asp Val Lys Gln Leu Thr Glu Ala Val Gln Lys Ile Ala Met Glu  
865 870 875 880

Ser Ile Val Ile Trp Gly Lys Thr Pro Lys Phe Arg Leu Pro Ile Gln  
885 890 895

Lys Glu Thr Trp Glu Thr Trp Trp Thr Asp Tyr Trp Gln Ala Thr Trp  
900 905 910

Ile Pro Glu Trp Glu Phe Val Asn Thr Pro Pro Leu Val Lys Leu Trp  
915 920 925

Tyr Gln Leu Glu Lys Asp Pro Ile Ala Gly Val Glu Thr Phe Tyr Val  
930 935 940

Ala Gly Ala Ala Asn Arg Glu Thr Lys Leu Gly Lys Ala Gly Tyr Val  
945 950 955 960

037583

Thr Asp Arg Gly Arg Gln Lys Ile Val Ser Leu Thr Glu Thr Thr Asn  
 965 970 975

Gln Lys Thr Ala Leu Gln Ala Ile Tyr Leu Ala Leu Gln Asp Ser Gly  
 980 985 990

Ser Glu Val Asn Ile Val Thr Ala Ser Gln Tyr Ala Leu Gly Ile Ile  
 995 1000 1005

Gln Ala Gln Pro Asp Lys Ser Glu Ser Glu Leu Val Asn Gln Ile  
 1010 1015 1020

Ile Glu Gln Leu Ile Lys Lys Glu Arg Val Tyr Leu Ser Trp Val  
 1025 1030 1035

Pro Ala His Lys Gly Ile Gly Gly Asn Glu Gln Val Asp Lys Leu  
 1040 1045 1050

Val Ser Ser Gly Ile Arg Lys Val Leu Phe Leu Asp Gly Ile Asp  
 1055 1060 1065

Lys Ala Gln Glu Glu His Glu Lys Tyr His Ser Asn Trp Arg Ala  
 1070 1075 1080

Met Ala Ser Asp Phe Asn Leu Pro Pro Val Val Ala Lys Glu Ile  
 1085 1090 1095

Val Ala Ser Cys Asp Gln Cys Gln Leu Lys Gly Glu Ala Met His  
 1100 1105 1110

Gly Gln Val Asp Cys Ser Pro Gly Ile Trp Gln Leu Ala Cys Thr  
 1115 1120 1125

His Leu Glu Gly Lys Ile Ile Leu Val Ala Val His Val Ala Ser  
 1130 1135 1140

Gly Tyr Ile Glu Ala Glu Val Ile Pro Ala Glu Thr Gly Gln Glu  
 1145 1150 1155

Thr Ala Tyr Phe Ile Leu Lys Leu Ala Gly Arg Trp Pro Val Lys  
 1160 1165 1170

## 037583

Val Ile His Thr Ala Asn Gly Ser Asn Phe Thr Ser Ala Ala Val  
1175 1180 1185

Lys Ala Ala Cys Trp Trp Ala Gly Ile Gln Gln Glu Phe Gly Ile  
1190 1195 1200

Pro Tyr Asn Pro Gln Ser Gln Gly Val Val Ala Ser Met Asn Lys  
1205 1210 1215

Glu Leu Lys Lys Ile Ile Gly Gln Val Arg Asp Gln Ala Glu His  
1220 1225 1230

Leu Lys Thr Ala Val Gln Met Ala Val Phe Ile His Asn Phe Lys  
1235 1240 1245

Arg Lys Gly Gly Ile Gly Gly Tyr Ser Ala Gly Glu Arg Ile Ile  
1250 1255 1260

Asp Ile Ile Ala Thr Asp Ile Gln Thr Lys Glu Leu Gln Lys Gln  
1265 1270 1275

Ile Ile Lys Ile Gln Asn Phe Arg Val Tyr Tyr Arg Asp Ser Arg  
1280 1285 1290

Asp Pro Ile Trp Lys Gly Pro Ala Lys Leu Leu Trp Lys Gly Glu  
1295 1300 1305

Gly Ala Val Val Ile Gln Asp Asn Ser Asp Ile Lys Val Val Pro  
1310 1315 1320

Arg Arg Lys Val Lys Ile Ile Lys Asp Tyr Gly Lys Gln Met Ala  
1325 1330 1335

Gly Ala Asp Cys Val Ala Gly Arg Gln Asp Glu Asp  
1340 1345 1350

<210> 4  
<211> 1341  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Последовательность мозаичного антигена Mos2.Gag-Pol

<400> 4

037583

Met Gly Ala Arg Ala Ser Ile Leu Arg Gly Gly Lys Leu Asp Lys Trp  
 1. 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys His Tyr Met Leu Lys  
 20 25 30

His Leu Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asn Pro  
 35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Lys Gln Ile Ile Lys Gln Leu  
 50 55 60

Gln Pro Ala Leu Gln Thr Gly Thr Glu Glu Leu Arg Ser Leu Phe Asn  
 65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Ala Glu Ile Glu Val Arg Asp  
 85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Gln  
 100 105 110

Gln Lys Thr Gln Gln Ala Lys Glu Ala Asp Gly Lys Val Ser Gln Asn  
 115 120 125

Tyr Pro Ile Val Gln Asn Leu Gln Gly Gln Met Val His Gln Pro Ile  
 130 135 140

Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Ile Glu Glu Lys Ala  
 145 150 155 160

Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Thr Ala Leu Ser Glu Gly Ala  
 165 170 175

Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln  
 180 185 190

Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Asp Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu  
 195 200 205

Trp Asp Arg Leu His Pro Val His Ala Gly Pro Val Ala Pro Gly Gln  
 210 215 220

037583

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

Gln Glu Gln Ile Ala Trp Met Thr Ser Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly  
 245 250 255

Asp Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg  
 260 265 270

Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Lys Gln Gly Pro Lys Glu  
 275 280 285

Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Phe Lys Thr Leu Arg Ala Glu  
 290 295 300

Gln Ala Thr Gln Asp Val Lys Asn Trp Met Thr Asp Thr Leu Leu Val  
 305 310 315 320

Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Arg Ala Leu Gly Pro  
 325 330 335

Gly Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly  
 340 345 350

Pro Ser His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser Gln Thr Asn  
 355 360 365

Ser Thr Ile Leu Met Gln Arg Ser Asn Phe Lys Gly Ser Lys Arg Ile  
 370 375 380

Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His Ile Ala Arg Asn Cys  
 385 390 395 400

Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys Gly Lys Glu Gly His  
 405 410 415

Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn Phe Leu Gly Lys Ile  
 420 425 430

Trp Pro Ser His Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe Leu Gln Ser Arg Pro  
 435 440 445

Glu Pro Thr Ala Pro Pro Ala Glu Ser Phe Arg Phe Glu Glu Thr Thr

037583

Pro Ala Pro Lys Gln Glu Pro Lys Asp Arg Glu Pro Leu Thr Ser Leu  
465 470 475 480

Arg Ser Leu Phe Gly Ser Asp Pro Leu Ser Gln Met Ala Pro Ile Ser  
485 490 495

Pro Ile Glu Thr Val Pro Val Lys Leu Lys Pro Gly Met Asp Gly Pro  
500 505 510

Lys Val Lys Gln Trp Pro Leu Thr Glu Glu Lys Ile Lys Ala Leu Val  
515 520 525

Glu Ile Cys Thr Glu Met Glu Lys Glu Gly Lys Ile Ser Lys Ile Gly  
530 535 540

Pro Glu Asn Pro Tyr Asn Thr Pro Ile Phe Ala Ile Lys Lys Lys Asp  
545 550 555 560

Ser Thr Lys Trp Arg Lys Leu Val Asp Phe Arg Glu Leu Asn Lys Arg  
565 570 575

Thr Gln Asp Phe Trp Glu Val Gln Leu Gly Ile Pro His Pro Ala Gly  
580 585 590

Leu Lys Lys Lys Lys Ser Val Thr Val Leu Ala Val Gly Asp Ala Tyr  
595 600 605

Phe Ser Val Pro Leu Asp Glu Asp Phe Arg Lys Tyr Thr Ala Phe Thr  
610 615 620

Ile Pro Ser Ile Asn Asn Glu Thr Pro Gly Ile Arg Tyr Gln Tyr Asn  
625 630 635 640

Val Leu Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro Ala Ile Phe Gln Ser Ser  
645 650 655

Met Thr Lys Ile Leu Glu Pro Phe Arg Lys Gln Asn Pro Asp Ile Val  
660 665 670

Ile Tyr Gln Tyr Met Ala Ala Leu Tyr Val Gly Ser Asp Leu Glu Ile  
675 680 685

037583

Gly Gln His Arg Thr Lys Ile Glu Glu Leu Arg Gln His Leu Leu Arg  
690 695 700

Trp Gly Phe Thr Thr Pro Asp Lys Lys His Gln Lys Glu Pro Pro Phe  
705 710 715 720

Leu Trp Met Gly Tyr Glu Leu His Pro Asp Lys Trp Thr Val Gln Pro  
725 730 735

Ile Val Leu Pro Glu Lys Asp Ser Trp Thr Val Asn Asp Ile Gln Lys  
740 745 750

Leu Val Gly Lys Leu Asn Trp Ala Ser Gln Ile Tyr Ala Gly Ile Lys  
755 760 765

Val Lys Gln Leu Cys Lys Leu Leu Arg Gly Thr Lys Ala Leu Thr Glu  
770 775 780

Val Val Pro Leu Thr Glu Glu Ala Glu Leu Glu Leu Ala Glu Asn Arg  
785 790 795 800

Glu Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val Tyr Tyr Asp Pro Ser Lys  
805 810 815

Asp Leu Ile Ala Glu Ile Gln Lys Gln Gly Gln Gly Gln Trp Thr Tyr  
820 825 830

Gln Ile Tyr Gln Glu Pro Phe Lys Asn Leu Lys Thr Gly Lys Tyr Ala  
835 840 845

Arg Met Arg Gly Ala His Thr Asn Asp Val Lys Gln Leu Thr Glu Ala  
850 855 860

Val Gln Lys Ile Ala Thr Glu Ser Ile Val Ile Trp Gly Lys Thr Pro  
865 870 875 880

Lys Phe Lys Leu Pro Ile Gln Lys Glu Thr Trp Glu Ala Trp Trp Thr  
885 890 895

Glu Tyr Trp Gln Ala Thr Trp Ile Pro Glu Trp Glu Phe Val Asn Thr  
900 905 910

## 037583

Pro Pro Leu Val Lys Leu Trp Tyr Gln Leu Glu Lys Glu Pro Ile Val  
 915 920 925

Gly Ala Glu Thr Phe Tyr Val Ala Gly Ala Ala Asn Arg Glu Thr Lys  
 930 935 940

Leu Gly Lys Ala Gly Tyr Val Thr Asp Arg Gly Arg Gln Lys Val Val  
 945 950 955 960

Ser Leu Thr Asp Thr Thr Asn Gln Lys Thr Ala Leu Gln Ala Ile His  
 965 970 975

Leu Ala Leu Gln Asp Ser Gly Leu Glu Val Asn Ile Val Thr Ala Ser  
 980 985 990

Gln Tyr Ala Leu Gly Ile Ile Gln Ala Gln Pro Asp Lys Ser Glu Ser  
 995 1000 1005

Glu Leu Val Ser Gln Ile Ile Glu Gln Leu Ile Lys Lys Glu Lys  
 1010 1015 1020

Val Tyr Leu Ala Trp Val Pro Ala His Lys Gly Ile Gly Gly Asn  
 1025 1030 1035

Glu Gln Val Asp Lys Leu Val Ser Arg Gly Ile Arg Lys Val Leu  
 1040 1045 1050

Phe Leu Asp Gly Ile Asp Lys Ala Gln Glu Glu His Glu Lys Tyr  
 1055 1060 1065

His Ser Asn Trp Arg Ala Met Ala Ser Glu Phe Asn Leu Pro Pro  
 1070 1075 1080

Ile Val Ala Lys Glu Ile Val Ala Ser Cys Asp Lys Cys Gln Leu  
 1085 1090 1095

Lys Gly Glu Ala Ile His Gly Gln Val Asp Cys Ser Pro Gly Ile  
 1100 1105 1110

Trp Gln Leu Ala Cys Thr His Leu Glu Gly Lys Val Ile Leu Val  
 1115 1120 1125

## 037583

Ala Val His Val Ala Ser Gly Tyr Ile Glu Ala Glu Val Ile Pro  
1130 1135 1140

Ala Glu Thr Gly Gln Glu Thr Ala Tyr Phe Leu Leu Lys Leu Ala  
1145 1150 1155

Gly Arg Trp Pro Val Lys Thr Ile His Thr Ala Asn Gly Ser Asn  
1160 1165 1170

Phe Thr Ser Ala Thr Val Lys Ala Ala Cys Trp Trp Ala Gly Ile  
1175 1180 1185

Lys Gln Glu Phe Gly Ile Pro Tyr Asn Pro Gln Ser Gln Gly Val  
1190 1195 1200

Val Ala Ser Ile Asn Lys Glu Leu Lys Lys Ile Ile Gly Gln Val  
1205 1210 1215

Arg Asp Gln Ala Glu His Leu Lys Thr Ala Val Gln Met Ala Val  
1220 1225 1230

Phe Ile His Asn Phe Lys Arg Lys Gly Gly Ile Gly Glu Tyr Ser  
1235 1240 1245

Ala Gly Glu Arg Ile Val Asp Ile Ile Ala Ser Asp Ile Gln Thr  
1250 1255 1260

Lys Glu Leu Gln Lys Gln Ile Thr Lys Ile Gln Asn Phe Arg Val  
1265 1270 1275

Tyr Tyr Arg Asp Ser Arg Asp Pro Leu Trp Lys Gly Pro Ala Lys  
1280 1285 1290

Leu Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala Val Val Ile Gln Asp Asn Ser  
1295 1300 1305

Asp Ile Lys Val Val Pro Arg Arg Lys Ala Lys Ile Ile Arg Asp  
1310 1315 1320

Tyr Gly Lys Gln Met Ala Gly Asp Asp Cys Val Ala Ser Arg Gln  
1325 1330 1335

Asp Glu Asp

037583

1340

<210> 5  
 <211> 679  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> тримерный белок gp140 субтипа С

<400> 5

Ala Glu Asn Leu Trp Val Gly Asn Met Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly  
 1. 5 10 15

Val Pro Val Trp Thr Asp Ala Lys Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp  
 20 25 30

Thr Lys Ala Tyr Asp Arg Glu Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala  
 35 40 45

Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro Gln Glu Ile Val Leu Glu Asn Val  
 50 55 60

Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn Asp Met Val Asp Gln Met His  
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys  
 85 90 95

Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu His Cys Thr Asn Ala Thr Phe Lys  
 100 105 110

Asn Asn Val Thr Asn Asp Met Asn Lys Glu Ile Arg Asn Cys Ser Phe  
 115 120 125

Asn Thr Thr Thr Glu Ile Arg Asp Lys Lys Gln Gln Gly Tyr Ala Leu  
 130 135 140

Phe Tyr Arg Pro Asp Ile Val Leu Leu Lys Glu Asn Arg Asn Asn Ser  
 145 150 155 160

Asn Asn Ser Glu Tyr Ile Leu Ile Asn Cys Asn Ala Ser Thr Ile Thr  
 165 170 175

037583

Gln Ala Cys Pro Lys Val Asn Phe Asp Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys  
180 185 190

Ala Pro Ala Gly Tyr Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe Ser  
195 200 205

Gly Lys Gly Pro Cys Asn Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly  
210 215 220

Ile Lys Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala  
225 230 235 240

Glu Lys Glu Ile Ile Ile Arg Ser Glu Asn Leu Thr Asp Asn Val Lys  
245 250 255

Thr Ile Ile Val His Leu Asn Lys Ser Val Glu Ile Val Cys Thr Arg  
260 265 270

Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Met Arg Ile Gly Pro Gly Gln Thr  
275 280 285

Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala Tyr Cys  
290 295 300

Asn Ile Ser Gly Ser Lys Trp Asn Glu Thr Leu Lys Arg Val Lys Glu  
305 310 315 320

Lys Leu Gln Glu Asn Tyr Asn Asn Asn Lys Thr Ile Lys Phe Ala Pro  
325 330 335

Ser Ser Gly Gly Asp Leu Glu Ile Thr Thr His Ser Phe Asn Cys Arg  
340 345 350

Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Arg Leu Phe Asn Asn Asn Ala  
355 360 365

Thr Glu Asp Glu Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile  
370 375 380

Asn Met Trp Gln Gly Val Gly Arg Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ala  
385 390 395 400

Gly Asn Ile Thr Cys Lys Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Val Arg

037583

405 410 415  
 Asp Gly Gly Glu Asp Asn Lys Thr Glu Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly  
 420 425 430  
 Gly Asn Met Lys Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val  
 435 440 445  
 Ile Glu Leu Lys Pro Leu Gly Ile Ala Pro Thr Gly Ala Lys Glu Arg  
 450 455 460  
 Val Val Glu Arg Glu Glu Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Val Phe Leu  
 465 470 475 480  
 Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Leu Thr  
 485 490 495  
 Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Ser Ile Val Gln Gln Gln  
 500 505 510  
 Ser Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Met Leu Gln Leu  
 515 520 525  
 Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Thr Arg Val Leu Ala Ile Glu  
 530 535 540  
 Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly  
 545 550 555 560  
 Lys Leu Ile Cys Thr Thr Asn Val Pro Trp Asn Ser Ser Trp Ser Asn  
 565 570 575  
 Lys Ser Gln Thr Asp Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp  
 580 585 590  
 Arg Glu Ile Ser Asn Tyr Thr Asp Thr Ile Tyr Arg Leu Leu Glu Asp  
 595 600 605  
 Ser Gln Thr Gln Gln Glu Lys Asn Glu Lys Asp Leu Leu Ala Leu Asp  
 610 615 620  
 Ser Trp Lys Asn Leu Trp Ser Trp Phe Asp Ile Ser Asn Trp Leu Trp  
 625 630 635 640

037583

Tyr Ile Lys Ser Arg Ile Glu Gly Arg Gly Ser Gly Gly Tyr Ile Pro  
645 650 655

Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp  
660 665 670

Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu  
675

<210> 6  
<211> 695  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> мозаичный химерный белок gp140

<400> 6

Ala Gly Lys Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys  
1. 5 10 15

Glu Ala Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp  
20 25 30

Thr Glu Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp  
35 40 45

Pro Asn Pro Gln Glu Val Val Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn  
50 55 60

Met Trp Lys Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser  
65 70 75 80

Leu Trp Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys  
85 90 95

Val Thr Leu Asn Cys Thr Asp Asp Val Arg Asn Val Thr Asn Asn Ala  
100 105 110

Thr Asn Thr Asn Ser Ser Trp Gly Glu Pro Met Glu Lys Gly Glu Ile  
115 120 125

Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Ser Ile Arg Asn Lys Val Gln



037583

Thr Trp Thr Trp Asn Asn Ser Thr Trp Asn Asn Thr Lys Arg Ser Asn  
 370 375 380

Asp Thr Glu Glu His Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile  
 385 390 395 400

Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Arg  
 405 410 415

Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg  
 420 425 430

Asp Gly Gly Asn Asp Thr Ser Gly Thr Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly  
 435 440 445

Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val  
 450 455 460

Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Glu Arg  
 465 470 475 480

Val Val Gln Arg Glu Glu Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Val Phe Leu  
 485 490 495

Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr  
 500 505 510

Leu Thr Val Gln Ala Arg Leu Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln  
 515 520 525

Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu  
 530 535 540

Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu  
 545 550 555 560

Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly  
 565 570 575

Lys Leu Ile Cys Thr Thr Thr Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn  
 580 585 590

Lys Ser Leu Asp Lys Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Glu  
595 600 605

Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile Tyr Thr Leu Ile Glu Glu  
610 615 620

Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp  
625 630 635 640

Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Ser Asn Trp Leu Trp  
645 650 655

Tyr Ile Lys Ser Arg Ile Glu Gly Arg Gly Ser Gly Gly Tyr Ile Pro  
660 665 670

Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp  
675 680 685

Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu  
690 695

<210> 7  
<211> 29  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> примерная лидерная последовательность для продуцирования тримерного стабилизированного белка gp140

<400> 7

Met Arg Val Arg Gly Ile Gln Arg Asn Cys Gln His Leu Trp Arg Trp  
1. 5 10 15

Gly Thr Leu Ile Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala  
20 25

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинированная вакцина для индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у субъекта, содержащая:

(i) первую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество одного или более векторов аденовируса 26 (rAd26), кодирующих антигенные полипептиды ВИЧ, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, и фармацевтически приемлемый носитель;

(ii) вторую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество выделенного полипептида оболочки ВИЧ, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, и фармацевтически приемлемый носитель; и

(iii) иммуногенно эффективное количество одного или более дополнительных векторов аденовируса 26 (rAd26), кодирующих дополнительные антигенные полипептиды ВИЧ, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4,

где первая композиция предназначена для прайм-иммунизации, а вторая композиция - для буст-иммунизации, и иммуногенно эффективное количество дополнительных векторов rAd26 присутствует в композиции для введения вместе со второй композицией для буст-иммунизации.

2. Комбинированная вакцина по п.1, где иммуногенно эффективное количество одного или более дополнительных векторов rAd26 присутствует в третьей композиции.

3. Комбинированная вакцина по п.1, где вторая композиция дополнительно содержит адьювант.

4. Комбинированная вакцина по п.3, где адьювант представляет собой фосфат алюминия.

5. Комбинированная вакцина по любому из пп.1-4, где выделенный полипептид оболочки ВИЧ содержит стабилизированный тример gp140 ВИЧ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

6. Применение комбинированной вакцины по любому из пп.1-5 в генерировании защитного иммунного ответа против ВИЧ-инфекции.

7. Набор для индукции иммунного ответа против ВИЧ-инфекции, содержащий комбинированную

вакцину по любому из пп.1-5.

8. Способ индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает:

(i) введение субъекту первой композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество одного или более векторов аденовируса 26 (rAd26), кодирующих антигенные полипептиды ВИЧ, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, и фармацевтически приемлемый носитель;

(ii) введение субъекту второй композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество выделенного полипептида оболочки ВИЧ, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, и фармацевтически приемлемый носитель; и

(iii) введение субъекту иммуногенно эффективного количества одного или более дополнительных векторов аденовируса 26 (rAd26), кодирующих дополнительные антигенные полипептиды ВИЧ, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4,

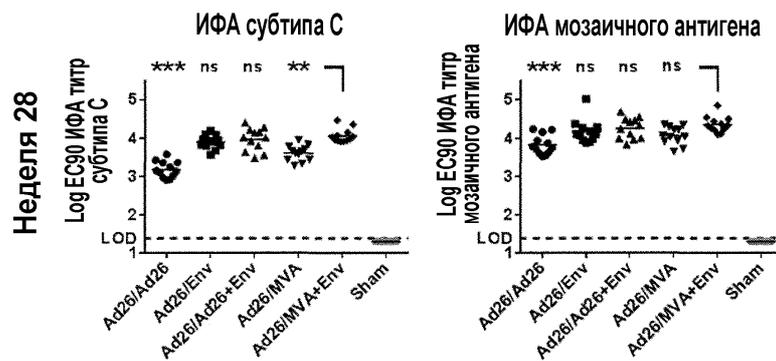
где стадия (i) предназначена для прайм-иммунизации, а стадия (ii) - для буст-иммунизации, и иммуногенно эффективное количество одного или более дополнительных векторов rAd26 присутствует в композиции, вводимой вместе со второй композицией для буст-иммунизации.

9. Способ по п.8, где иммуногенно эффективное количество одного или более дополнительных векторов rAd26 присутствует в третьей композиции.

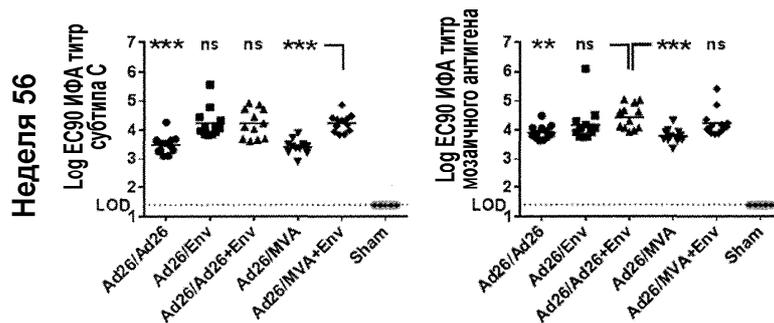
10. Комбинированная вакцина по п.8, где вторая композиция дополнительно содержит адьювант.

11. Комбинированная вакцина по п.10, где адьювант представляет собой фосфат алюминия.

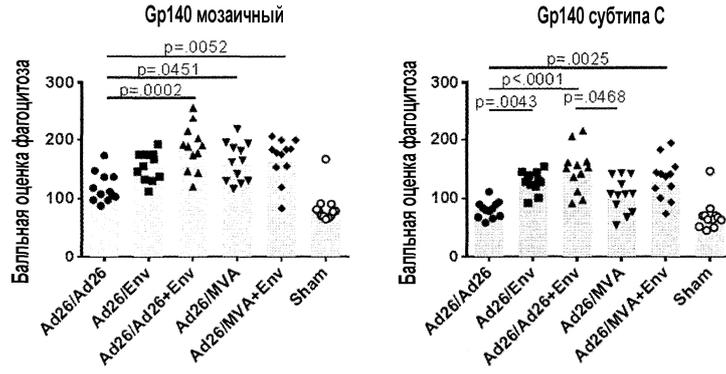
12. Способ по любому из пп.8-11, где выделенный полипептид оболочки ВИЧ содержит стабилизированный тример gp140 ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.



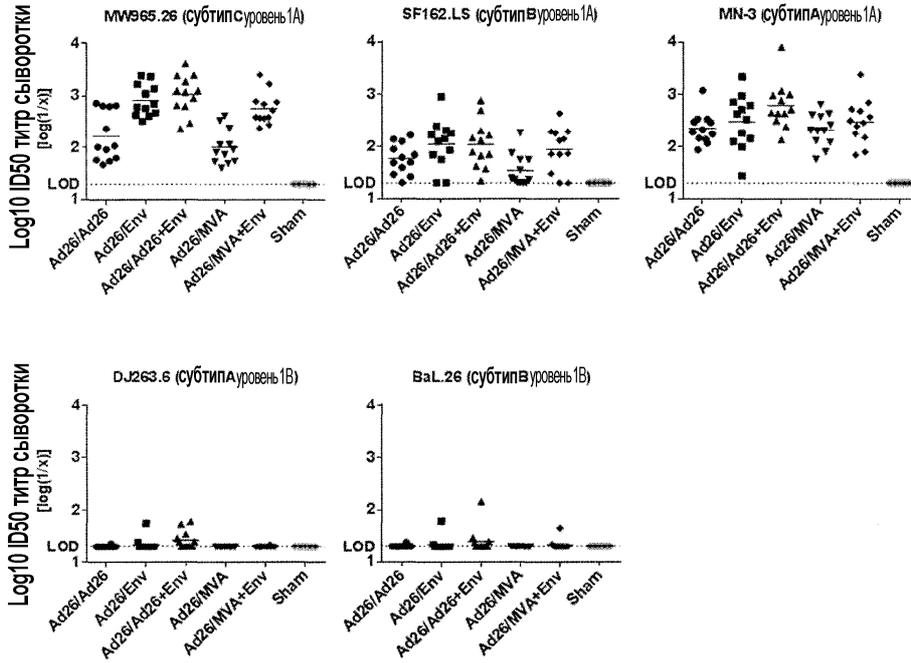
Фиг. 1А



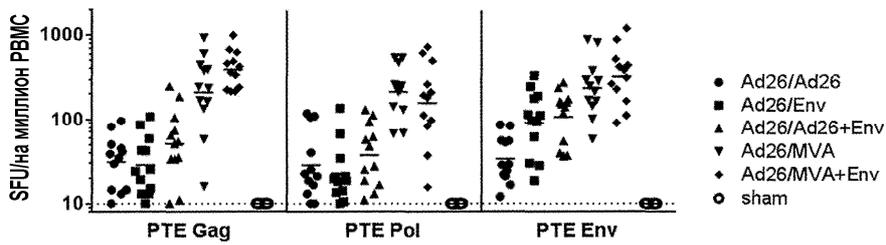
Фиг. 1В



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

