

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038974**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.17

(21) Номер заявки
201891415

(22) Дата подачи заявки
2016.12.15

(51) Int. Cl. **C07K 14/16** (2006.01)

(54) АНТИГЕНЫ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА, ВЕКТОРЫ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 15200138.4; 16194124.0

(32) 2015.12.15; 2016.10.17

(33) EP

(43) 2018.11.30

(86) PCT/EP2016/081159

(87) WO 2017/102929 2017.06.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЯНССЕН ВЭКЦИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:
**Лангедейк Йоханнес Петрус Мария,
Каллэндре Бенуа Кристоф Стефан,
Ван Манен Даниэль, Краруп Андерс,
Штиц Йорн, Вегманн Франк,
Веллингга Йорт (NL)**

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

(56) WO-A1-2010059732

"RecName: Full=Endogenous retrovirus group K member 9 Env polyprotein {ECO:0000256|SAAS:SAAS00159347}; AltName: Full=Endogenous retrovirus group K member 113 Env polyprotein {ECO:0000256|SAAS:SAAS00159454}; AltName: Full=Endogenous retrovirus group K member 13-1 Env polyprotein {ECO:0000256|SAAS:SAAS", UNIPROT, 1 March 2005 (2005-03-01), XP002757477, [retrieved on 2005-03-01] the whole document

COMPANS R.W. ET AL.: "Recombinant protein gp41 heterologous transmembrane region, SEQ ID 1", GENESEQ, 15 January 2009 (2009-01-15), XP002757478, [retrieved on 2009-03-19] the whole document

MARASCO W.A.: "Transmembrane domain peptide, SEQ ID 14", GENESEQ, 26 January 2006 (2006-01-26), XP002757479, [retrieved on 2006-03-23] the whole document

"GCN4 fusion linker peptide, SEQ ID NO 3", GENESEQ, 11 January 2007 (2007-01-11), XP002757480, [retrieved on 2007-03-08] the whole document

(57) Описаны синтетические белки оболочки HIV, векторы и композиции на их основе, а также способы индукции защитного иммунитета к инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита человека (HIV). Вирусные векторы экспрессии, кодирующие синтетические белки оболочки HIV, можно применять в вакцинах для обеспечения улучшенного защитного иммунитета к HIV.

B1

038974

**038974
B1**

Предпосылки изобретения

Вирус иммунодефицита человека (HIV) поражает миллионы людей во всем мире, и предупреждение HIV с помощью эффективной вакцины по-прежнему имеет первостепенное значение даже в эпоху широкого распространения антиретровирусной терапии. HIV-1 представляет собой наиболее распространенный и патогенный штамм вируса, при этом более 90% случаев HIV/AIDS обусловлены инфицированием HIV-1 группы М. Группа М дополнительно подразделяется на клады или подтипы. В идеале эффективная вакцина будет способна вызывать как сильные клеточные ответы, так и выработку нейтрализующих антител широкого спектра действия, способных нейтрализовать штаммы HIV-1 различных клад.

Высокая генетическая изменчивость HIV-1 делает разработку вакцины против HIV-1 беспрецедентной задачей. С целью улучшения охвата потенциальных Т-клеточных эпитопов и улучшения клеточных ответов "мозаичные" антигены Gag, Pol и Env HIV-1, полученные из белков группового антигена (Gag), полимеразных белков (Pol) и белков оболочки (Env) HIV, были описаны другими авторами и разработаны в попытке обеспечить максимальный охват потенциальных Т-клеточных эпитопов (например, Barouch et al., Nat. Med. 2010, 16: 319-323). Мозаичные антигены схожи по длине и доменной структуре со встречающимися в природе антигенами HIV-1 дикого типа.

Например, описанные и применяемые в вакцинах мозаичные антигены HIV включают в себя антигены, описанные в Barouch et al. выше, и WO 2010/059732, как, например,

(a) мозаичные антигены Gag, содержащие:

(a)(i) первую последовательность мозаичного Gag ("mos1Gag"), имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в данном документе под SEQ ID NO: 1, и

(a)(ii) вторую последовательность мозаичного Gag ("mos2Gag"), имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в данном документе под SEQ ID NO: 2;

(b) мозаичные антигены Pol, содержащие:

(b)(i) первую последовательность мозаичного Pol ("mos1Pol"), имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в данном документе под SEQ ID NO: 3, и

(b)(ii) вторую последовательность мозаичного Pol ("mos2Pol"), имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в данном документе под SEQ ID NO: 4; и

(c) мозаичные антигены Env, содержащие:

(c)(i) первую последовательность мозаичного Env ("mos1Env"), имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в данном документе под SEQ ID NO: 5, и

(c)(ii) вторую последовательность мозаичного Env ("mos2Env"), имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в данном документе под SEQ ID NO: 6.

Последовательности, кодирующие эти антигены, клонировали в векторы, например, такие как рекомбинантные аденовирусные векторы, например, на основе рекомбинантного аденовируса серотипа 26 (rAd26), и эти рекомбинантные векторы ранее применяли в качестве вакцин для формирования иммунных ответов на антигены (см., например, Barouch et al. выше и WO 2010/059732). Например, последовательности мозаичных антигенов mos1Gag и mos1Pol, как правило, объединяют в слитый белок из Gag и Pol ("mos1GagPol"), и при этом его кодирующую последовательность клонируют в первый вектор на основе Ad26 ("rAd26.mos1GagPol"); а последовательности антигенов mos2Gag и mos2Pol объединяют в другой слитый белок из Gag и Pol ("mos2GagPol"), и при этом его кодирующую последовательность клонируют во второй вектор на основе Ad26 ("rAd26.mos2GagPol"). Конструкции, кодирующие mos1Env и mos2Env, как правило, клонируют в отдельные векторы на основе Ad26 (соответственно, "rAd26.mos1Env" и "rAd26.mos2Env").

Совокупность таких мозаичных антигенов, описанных выше, дает хороший глобальный охват изолятов HIV-1 группы М, где векторы на основе rAd26, кодирующие последовательности 1 мозаичных антигенов (например, rAd26.mos1GagPol и rAd26.mos1Env), предпочтительны для клады В и подтипов CRF01 HIV-1, а векторы на основе rAd26, кодирующие последовательности 2 мозаичных антигенов (например, rAd26.mos2GagPol и rAd26.mos2Env), предпочтительны для штаммов клады С. Мозаичные антигены Gag, Pol и Env HIV-1, экспрессируемые векторами на основе rAd26, можно применять для улучшения как спектра, так и интенсивности антигенспецифических Т-лимфоцитарных ответов у макаков-резусов без снижения величины как клеточных, так и гуморальных ответов по сравнению с антигенами HIV-1 с консенсусной или природной последовательностью (Barouch et al. выше и WO 2010/059732).

Однако при дополнительных попытках разработки компонентов вакцины, описанных выше, было обнаружено, что rAd26.mos2Env демонстрирует неоптимальную экспрессию на поверхности клеток и иммунный ответ у отличных от человека приматов и, кроме того, проявляет неожиданную и непредсказуемую неоптимальную генетическую стабильность в ходе процесса изготовления, о которой не сообщалось до настоящего времени, по сравнению с другими векторами на основе rAd26, как, например, rAd26.mos1Env. Таким образом, вакцины, содержащие rAd26.mos2Env, могут обуславливать неоптимальные иммунные ответы на подтипы HIV-1 клады С, поскольку мозаичный антиген mos2Env предпочтителен для штаммов HIV-1 клады С. Соответственно, существует необходимость в альтернативе анти-

гену *mos2Env* в вакцинах против HIV, которую можно применять для индукции улучшенных иммунных ответов на HIV-1 клады С.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к новым синтетическим белкам оболочки вируса иммунодефицита человека (HIV), которые характеризуются улучшенной экспрессией на поверхности клеток и генетической стабильностью по сравнению с ранее описанным антигеном *mos2Env*. Настоящее изобретение также относится к композициям и способам применения таких новых синтетических белков оболочки HIV и/или последовательностей, кодирующих их, для индукции иммунных ответов увеличенной интенсивности на HIV-1, в частности HIV-1 клады С, предпочтительно при применении в комбинации с другими антигенами HIV.

В одном общем аспекте настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 8, имеющую одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из (i) I529P (т.е. замены Ile на Pro в положении 529 SEQ ID NO: 8), (ii) K480E (т.е. замены Lys на Glu в положении 480 SEQ ID NO: 8) и (iii) комбинации EK479-480RRRR (т.е. замещения Glu-Lys в положениях 479-480 SEQ ID NO: 8 четырьмя последовательными остатками Arg), I529P, A471C (т.е. замены Ala на Cys в положении 471 SEQ ID NO: 8) и T575C (т.е. замены Thr на Cys в положении 575 SEQ ID NO: 8). В одном варианте осуществления синтетический белок оболочки HIV дополнительно содержит сигнальную последовательность, например сигнальную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9-12. В одном варианте осуществления сигнальная последовательность имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9.

В определенных вариантах осуществления синтетический белок оболочки HIV дополнительно содержит трансмембранный домен, предпочтительно трансмембранный домен, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13.

В определенных вариантах осуществления синтетический белок оболочки HIV дополнительно содержит фрагмент цитоплазматического домена, предпочтительно фрагмент цитоплазматического домена, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или ее аминокислоты 1-4 (т.е. NRVR). В вариантах осуществления, где синтетический белок оболочки HIV дополнительно содержит трансмембранный домен и фрагмент цитоплазматического домена, предпочтительно, чтобы белок также содержал аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37, слитую с карбоксильным концом (С-концом) SEQ ID NO: 8 и аминоконцом (N-концом) трансмембранной области.

В другом варианте осуществления синтетический белок оболочки HIV содержит тримеризационный домен, например тримеризационный домен, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15 (GCN4) или SEQ ID NO: 16 (домен фолдон). В одном предпочтительном варианте осуществления тримеризационный домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15. Такие варианты осуществления с тримеризационными доменами применимы для растворимых (т.е. не мембраносвязанных) синтетических белков оболочки HIV, в основе которых лежат последовательности эктодоменов, представленные в данном документе, как, например, белков, содержащих аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, где тримеризационный домен расположен на С-конце синтетического белка оболочки HIV.

В еще нескольких вариантах осуществления синтетический белок оболочки HIV содержит SEQ ID NO: 8 со следующими мутациями: EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C. Введение 6 последовательных аргининовых остатков (в положениях 478 и 481 в нативной последовательности SEQ ID NO: 8 уже находятся остатки Arg) приводит к дополнительной оптимизации участка расщепления фурином, вследствие чего получают улучшенный процессированный (т.е. расщепленный) эктодомен. Три мутации I529P, A471C и T575C известны как мутации SOSIP, из которых две последние мутации приводят к введению возможного дисульфидного мостика между новосозданными цистеиновыми остатками. В целом, эти мутации приводят к образованию растворимого тримеризованного синтетического белка оболочки HIV без необходимости в тримеризационном домене.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 или аминокислоты 1-686 SEQ ID NO: 19. Синтетический белок оболочки HIV, кодируемый нуклеиновой кислотой, наиболее предпочтительно содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18 или состоит из нее.

В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок оболочки HIV согласно варианту осуществления настоящего изобретения. В одном варианте осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В предпочтительном варианте осуществления вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор. В одном предпочтительном варианте осуществления аденовирусный вектор представляет собой вектор на основе аденовируса серотипа 26.

Другой общий аспект настоящего изобретения относится к композиции, предпочтительно вакцинной композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество вектора согласно варианту осуществ-

ствления настоящего изобретения и носитель, где нуклеиновая кислота, кодирующая синтетический белок оболочки HIV, функционально связана с последовательностью промотора. В одном варианте осуществления композиция содержит аденовирусный вектор, предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26, кодирующий синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к вакцинной комбинации для индукции иммунного ответа на вирус иммунодефицита человека (HIV) у субъекта, нуждающегося в этом. Вакцинная комбинация содержит первую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество вектора, предпочтительно аденовирусного вектора, более предпочтительно вектора на основе аденовируса серотипа 26, кодирующего синтетический белок оболочки HIV, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, вторую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество второго вектора, предпочтительно второго аденовирусного вектора, более предпочтительно второго вектора на основе аденовируса серотипа 26, кодирующего антигенный полипептид HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и необязательно по меньшей мере одну дополнительную композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество по меньшей мере одного, выбранного из группы, состоящей из вектора, кодирующего антигенный полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4, 28 и 29, и полипептида, содержащего иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида HIV, в том числе без ограничения полипептида, имеющего остатки 30-708 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7, или полипептида, имеющего остатки 30-724 SEQ ID NO: 36, где первая композиция, вторая композиция и необязательная дополнительная композиция присутствуют в одной и той же композиции или в одной или нескольких разных композициях.

Еще один общий аспект настоящего изобретения относится к способам индукции иммунного ответа на вирус иммунодефицита человека (HIV) у субъекта, нуждающегося в этом, включающим введение субъекту композиции или вакцинной комбинации согласно варианту осуществления настоящего изобретения. Настоящее изобретение также относится к способам индукции иммунного ответа на HIV, включающим примирование и усиление иммунного ответа с помощью композиции или вакцинной комбинации согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

Еще один дополнительный аспект настоящего изобретения относится к синтетическому белку оболочки HIV, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 8, имеющую одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из (i) I529P, (ii) K480E, (iii) комбинации EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C. В одном варианте осуществления синтетический белок оболочки HIV содержит SEQ ID NO: 8 с мутациями EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C. В другом варианте осуществления синтетический белок оболочки HIV содержит остатки 30-704 или 30-711 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 18. В еще одном варианте осуществления синтетический белок оболочки HIV содержит остатки 30-686 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 19.

Другой аспект настоящего изобретения относится к клетке, предпочтительно выделенной клетке, содержащей вектор согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

Краткое описание некоторых представлений графических материалов

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

На графических материалах изображено следующее:

фиг. 1A-1C представляют собой схематические представления структуры белков оболочки HIV; на фиг. 1A показан полноразмерный белок оболочки HIV; на фиг. 1B показана структура растворимого одноцепочечного белка оболочки HIV согласно варианту осуществления настоящего изобретения, в котором трансмембранный домен (TM) замещен тримеризационным доменом GCN4, а участок расщепления фурином подвергнут мутации (sC4); на фиг. 1C показана структура мембраносвязанного белка оболочки HIV согласно варианту осуществления настоящего изобретения, содержащего трансмембранный домен и фрагмент цитоплазматического домена (C4D7);

на фиг. 2 показаны уровни экспрессии растворимого белка оболочки sC1, в основе которого лежит последовательность мозаичного антигена mos2Env с дополнительным С-концевым тримеризационным доменом, и растворимого синтетического белка оболочки HIV (sC4) согласно варианту осуществления настоящего изобретения; экспрессию измеряли с помощью количественного вестерн-блоттинга с применением поликлонального антитела к gp120; плазмиды, кодирующие sC1 или sC4, дважды подвергали транзientной экспрессии, и каждую трансфекцию дважды количественно оценивали с помощью денситометрии; белок sC1 демонстрировал очень низкие уровни экспрессии по сравнению с синтетическим белком оболочки HIV sC4, который демонстрировал относительно высокие уровни экспрессии;

на фиг. 3A и 3B показано связывание синтетических белков оболочки HIV с моноклональным антителом 17b (mAb17b) в присутствии (светло-серым цветом) и в отсутствие (темно-серым цветом) раство-

римого CD4, которое определяли с помощью ELISA-анализа; на фиг. 3А показано связывание sC1; на фиг. 3В показано связывание sC4;

на фиг. 4 показана картина вестерн-блоттинга после нативного электрофореза в полиакриламидном геле белка sC1 и синтетического белка оболочки HIV sC4;

на фиг. 5 показаны относительные уровни экспрессии на поверхности клеток для мембраносвязанных синтетических белков оболочки HIV C1, C1D7, C4 и C4D7, определенные с помощью FACS-анализа клеток, экспрессирующих эти белки, с применением поликлонального антитела к gp120 (GP120) и с помощью связывания с нейтрализующими антителами широкого спектра действия PG9 (PG9) и PG16 (PG16), связывание с которыми зависит от четвертичной структуры и которые преимущественно связываются с правильно свернутым тримером Env;

фиг. 6 представляет собой графическое представление стабильности аденовирусных векторов, содержащих последовательности, кодирующие синтетические белки оболочки HIV по настоящему изобретению, в том числе полноразмерный C4 (FLC4), C4D7 и sC4, после нескольких пассажей вируса; рекомбинантные векторы на основе аденовируса серотипа 26 получали в клетках PER.C6; после первоначальных 3 пассажей для трансфекции и очистки методом бляшкообразования 5 бляшек отбирали и разращивали в течение 10 пассажей в формате T25, в результате чего общее число пассажей вируса (vpn) составляло 13; при этом показана стабильность после vpr 3, 5, 10 и 13, которую определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) кассеты экспрессии трансгена в E1; например, 3/5 означает, что из 5 тестируемых бляшек 3 бляшки были стабильными, и 5/5 означает, что из 5 тестируемых бляшек 5 бляшек были стабильными; и

на фиг. 7А и 7В показаны титры вируснейтрализующих антител к псевдотипированным оболочечным вирусным частицам (EVP) HIV-1 в анализе нейтрализации с использованием клеток TZM-b1 у кроликов; в группах, получавших высокую дозу аденовирусного вектора, измеряли log₁₀-преобразованные значения IC₅₀ антител к EVP VSV-G (отрицательный контроль) и MW965.26 (категория 1А, клада С) в недели 1, 8, 14 и 20; каждая точка обозначает log₁₀-преобразованное значение IC₅₀ у отдельного кролика, при этом среднее групповое значение указано горизонтальной линией; HD: наиболее сильное тестируемое разведение (верхняя сплошная линия); LD: наиболее слабое тестируемое разведение (нижняя сплошная линия); LOB: предел фонового уровня, значение 95 перцентиля для собранных отрицательных образцов (пунктирная линия); log₁₀-преобразованные значения IC₅₀, превышающие пороговые значения LD или HD, были обозначены на соответствующей линии; для каждого момента времени проводили одностороннее непараметрическое сравнение с контролем с помощью метода Данна для совместного ранжирования; статистически значимые различия указаны на графиках: * = P < 0,05, ** = P < 0,01 и *** = P < 0,001; на фиг. 7А показаны результаты с VSV-G (отрицательный контроль); а на фиг. 7В показаны результаты с MW965.26 (категория 1А, клада С).

Подробное описание изобретения

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

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

Как используется в данном документе, "субъект" означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека, которым будут вводить или вводили вектор, композицию или комбинированную вакцину согласно вариантам осуществления настоящего изобретения. Используемый в данном документе термин "млекопитающее" охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают без ограничения коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т.д., более предпочтительно человека.

Настоящее изобретение в целом относится к синтетическим белкам оболочки HIV, нуклеиновой кислоте и векторам, кодирующим синтетические белки оболочки HIV, и способам индукции иммунного ответа на HIV с помощью векторов, кодирующих синтетические белки оболочки HIV, или синтетических белков оболочки HIV в отдельности или в комбинации с одним или несколькими дополнительными векторами, кодирующими один или несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV, и/или в комбинации с одним или несколькими дополнительными выделенными антигенными полипептидами

HIV.

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

HIV подразделяется на несколько клад с высокой степенью генетической дивергенции. Используемый в данном документе термин "клада HIV" или "подтип HIV" относится к родственным вирусам иммунодефицита человека, классифицированным согласно их степени генетического сходства. В настоящее время насчитывается три группы изолятов HIV-1: M, N и O. Группа M (главные штаммы) состоит из по меньшей мере десяти клад от A до J. Группа O (отдаленные штаммы) может состоять из аналогичного числа клад. Группу N представляет новый изолят HIV-1, который не был отнесен ни к одной из групп M или O.

Используемые в данном документе термины "антигенный полипептид HIV", "антигенный белок HIV" и "иммуноген HIV" относятся к полипептиду, способному индуцировать иммунный ответ, например гуморальный и/или клеточноопосредованный ответ, на HIV у субъекта. Антигенный полипептид может представлять собой белок HIV, его фрагмент или эпитоп или комбинацию нескольких белков HIV или их частей, которые могут индуцировать иммунный ответ или обеспечивать выработку иммунитета, например защитного иммунитета, к HIV у субъекта.

Антигенный полипептид предпочтительно способен порождать в организме хозяина защитный иммунный ответ, например индуцировать иммунный ответ на вирусное заболевание или инфекцию, и/или обеспечивать выработку у субъекта иммунитета к вирусному заболеванию или инфекции (т.е. вакцинировать его), который защищает субъекта от вирусного заболевания или инфекции. Например, антигенный полипептид может содержать белок или его фрагменты из вируса иммунодефицита обезьян (SIV) или HIV, такой как белок gp160 оболочки HIV или SIV, белки матрикса/капсидные белки HIV или SIV и продукты генов gag, pol и env HIV или SIV.

Антигенный полипептид HIV может представлять собой любой антиген HIV-1 или HIV-2 или его фрагмент. Примеры антигенов HIV включают в себя без ограничения продукты генов gag, pol и env, которые кодируют структурные белки и существенно важные ферменты. Продукты генов gag, pol и env синтезируются в виде полипротеинов, которые дополнительно процессируются до нескольких других белковых продуктов. Основной белковый продукт гена gag представляет собой полипротеин gag, являющийся вирусным структурным белком, который дополнительно процессируется до белковых продуктов MA, CA, SP1, NC, SP2 и P6. Ген pol кодирует вирусные ферменты (Pol, полимеразу), и основной белковый продукт дополнительно процессируется до белковых продуктов RT, RNКазы H, IN и PR. Ген env кодирует структурные белки, в частности гликопротеины оболочки вириона. Основной белковый продукт гена env представляет собой gp160, который дополнительно процессируется до gp120 и gp41. Другие примеры антигенов HIV включают в себя белки Tat и Rev, регулирующие экспрессию генов; акцессорные белки Nef, Vrg, Vif и Vpr; капсидные белки, нуклеокапсидные белки и вирусный белок p24.

В определенных вариантах осуществления антигенный полипептид HIV содержит антиген Gag, Env или Pol HIV или любую их антигенную часть или эпитоп или их комбинацию, предпочтительно антиген Gag, Env или Pol HIV-1 или любую их антигенную часть или эпитоп или их комбинацию.

Антигенные полипептиды HIV также могут представлять собой мозаичные антигены HIV. Как используется в данном документе, "мозаичный антиген" относится к рекомбинантному белку, собранному из фрагментов природных последовательностей. Мозаичные антигены имеют сходство с природными антигенами, но являются оптимизированными с целью максимального увеличения охвата потенциальных Т-клеточных эпитопов, обнаруживаемых в природных последовательностях, что улучшает спектр и охват иммунного ответа. Мозаичные антигены HIV для применения в настоящем изобретении предпочтительно представляют собой мозаичные антигены Gag, Pol, и/или Env и более предпочтительно мозаичные антигены Gag, Pol, и/или Env HIV-1. Как используется в данном документе, "мозаичный антиген Gag, Pol и/или Env HIV" относится, в частности, к мозаичному антигену, содержащему несколько эпитопов, полученных из одной или нескольких последовательностей полипротеинов Gag, Pol и/или Env HIV.

В одном варианте осуществления мозаичный антиген HIV для применения в настоящем изобретении представляет собой мозаичный антиген Gag HIV с эпитопами, полученными из последовательностей продуктов гена gag (примеры представлены под SEQ ID NO: 1, 2); мозаичный антиген Pol HIV с эпитопами, полученными из последовательностей продуктов гена pol (примеры представлены под SEQ ID NO: 3, 4); или мозаичный антиген Env HIV с эпитопами, полученными из последовательностей продуктов гена env (примеры представлены под SEQ ID NO: 5, 6; новые антигены по настоящему изобретению, например, под SEQ ID NO: 8, 17, 18, 19, также могут считаться мозаичными антигенами Env HIV). В определенных вариантах осуществления мозаичный антиген HIV для применения в настоящем изобретении может содержать комбинацию эпитопов, полученных из последовательностей продуктов генов gag, pol и/или env. Иллюстративные и неограничивающие примеры включают в себя мозаичные антигены Env-Pol с эпитопами, полученными из последовательностей продуктов генов env и pol; 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. Последовательности продуктов генов gag, pol и env можно получить из одной или нескольких клад.

Примеры мозаичных антигенов Gag, Pol и/или Env HIV, которые можно применять в настоящем изобретении, включают антигены, описанные, например, в US 20120076812; Barouch et al., Nat. Med. 2010, 16:319-323; и Barouch et al., Cell. 155:1-9, 2013, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Мозаичные антигены Gag, Pol и/или Env HIV для применения в настоящем изобретении предпочтительно включают в себя без ограничения mos1Gag (SEQ ID NO: 1), mos2Gag (SEQ ID NO: 2), mos1Pol (SEQ ID NO: 3), mos2Pol (SEQ ID NO: 4), mos1Env (SEQ ID NO: 5), mos2Env (SEQ ID NO: 6), mos1GagPol (SEQ ID NO: 28), mos2GagPol (SEQ ID NO: 29) и их комбинации.

Каждый из используемых в данном документе терминов "белок оболочки HIV", "белок env" и "Env" относится к белку, который экспрессируется в оболочке вириона HIV и обеспечивает нацеливание HIV на плазматическую мембрану клеток, инфицированных HIV, и его прикрепление к ней или его фрагменту или производному, которые могут индуцировать иммунный ответ на HIV или обеспечивать выработку иммунитета к нему у субъекта, нуждающегося в этом. Ген env HIV кодирует белок-предшественник gp160, который подвергается протеолитическому расщеплению на два зрелых гликопротеина оболочки gp120 и gp41. Реакцию расщепления в последовательности, высококонсервативной среди предшественников гликопротеинов оболочки ретровирусов, опосредует протеаза клетки-хозяина фурин. Более конкретно, gp160 тримеризируется до (gp160)₃, а затем подвергается расщеплению на два нековалентно связанных gp120 и gp41. Проникновение вируса в клетку затем опосредует тример гетеродимеров gp120/gp41. Gp120 представляет собой рецепторсвязывающий фрагмент и связывается с CD4-рецептором на клетке-мишени, которая имеет рецептор, такой как, например, Т-хелперная клетка. Gp41, который нековалентно связан с gp120, представляет собой слитый фрагмент и обеспечивает прохождение второй стадии, посредством которой HIV проникает в клетку. Gp41 изначально погружен в оболочку вируса, но когда gp120 связывается с CD4-рецептором, gp120 меняет свою конформацию, что приводит к тому, что gp41 становится доступным и в этом случае может способствовать слиянию с клеткой-хозяином. Gp140 представляет собой нерасщепленный эктодомен тримерного gp160, т.е. (gp160)₃, который применяли в качестве идентификатора нативного состояния расщепленного "шипа" вируса.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения "белок оболочки HIV" может представлять собой белок gp160, gp140, gp120, gp41, их комбинации, продукты слияния, усеченные формы или производные. Например, "белок оболочки HIV" может содержать белок gp120, нековалентно связанный с белком gp41. Он также может содержать стабилизированный тримерный белок gp140, который может иметь тримеризационный домен, стабилизирующий тримеры gp140, или может быть модифицирован таким образом, чтобы содержать его. Примеры тримеризационных доменов включают без ограничения тримеризационный домен "фолдон" фибритина T4; суперспиральный тримеризационный домен, полученный из GCN4; и каталитическую субъединицу аспартаттранскарбамоилазы E. coli в качестве метки тримеризации. "Белок оболочки HIV" также может представлять собой усеченный белок оболочки HIV, в том числе без ограничения белки оболочки, содержащие С-концевое усечение в эктодоме (т.е. домене, который выступает во внеклеточное пространство), усечение в gp41, такое как усечение в трансмембранном домене gp41 или усечение в цитоплазматическом домене gp41. "Белок оболочки HIV" может дополнительно представлять собой производное встречающегося в природе белка оболочки HIV, имеющее мутации в последовательности, например, в участках расщепления фурином, и/или так называемые мутации SOSIP.

"Белок оболочки HIV" предпочтительно представляет собой "синтетический белок оболочки HIV". Используемый в данном документе термин "синтетический белок оболочки HIV" относится к не встречающемуся в природе белку оболочки HIV, который оптимизирован для индукции иммунного ответа на один или несколько встречающихся в природе штаммов HIV или обеспечения выработки иммунитета к ним у субъекта, нуждающегося в этом. Мозаичные белки Env HIV являются примерами синтетических белков Env HIV, и в настоящем изобретении представлены новые синтетические антигены Env HIV, например, содержащие SEQ ID NO: 8, 17, 18 или 19.

Синтетические белки оболочки HIV и последовательности, кодирующие их.

Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к новым синтетическим белкам оболочки HIV и молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим их.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к синтетическому белку оболочки HIV, содержащему аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 8, имеющую одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из (i) I529P, (ii) K480E и (iii) комбинации EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C. SEQ ID NO: 8 содержит синтетический зрелый gp120 и синтетический усеченный gp41 без трансмембранной области, а также без цитоплазматического домена. SEQ ID NO: 8 представляет собой не встречающуюся в природе последовательность, состоящую из химерного продукта сочетания последовательностей мозаичного антигена mos2Env (SEQ ID NO: 6) и последовательностей другого белка оболочки HIV.

Последовательность нового синтетического антигена Env, содержащая SEQ ID NO: 8, оптимизиро-

вана для обеспечения широкого охвата и усиления Т-клеточного ответа на HIV кланды С (по сравнению с антигеном mos2Env (SEQ ID NO: 6)). В определенных вариантах осуществления дополнительные аминокислоты могут быть добавлены в SEQ ID NO: 8 или один из ее вариантов, определенных в данном документе.

В определенных вариантах осуществления синтетический белок оболочки HIV дополнительно содержит сигнальную последовательность. Синтетический белок оболочки HIV синтезируется с сигнальной последовательностью, которая отщепляется от растущей полипептидной цепи в ходе ее транспорта в просвет эндоплазматического ретикулума (ER). В принципе можно применять любую известную сигнальную последовательность. Предпочтительно применяют сигнальную последовательность Env HIV или ее вариант. Из уровня техники известно применение различных сигнальных последовательностей для белков Env HIV (см., например, WO 2014/107744). В определенных вариантах осуществления сигнальная последовательность содержит SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12. В одном предпочтительном варианте осуществления сигнальная последовательность содержит SEQ ID NO: 9.

В определенных вариантах осуществления синтетический белок оболочки HIV дополнительно содержит трансмембранный домен. Трансмембранный домен заякоривает синтетический белок оболочки HIV на мембране ER и способствует мембранной сборке и функционированию оболочки HIV. Трансмембранный домен предпочтительно содержит SEQ ID NO: 13.

В другом варианте осуществления синтетический белок оболочки HIV содержит gp41, имеющий усеченный цитоплазматический домен. Gp41 имеет весьма длинный цитоплазматический домен на своем карбоксильном конце, как правило, из приблизительно 150 аминокислот (Edwards et al., J. Virology, 2002, 76:2683-2691). Сообщалось, что усечение цитоплазматического домена индуцирует переход консервативных областей в эктодомене белка Env HIV-1 в состояние доступности (там же). Размер усеченного цитоплазматического домена в синтетическом белке оболочки HIV по настоящему изобретению может находиться в диапазоне от одной до приблизительно 140 аминокислот, как, например, составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130 или 140 аминокислот полноразмерного цитоплазматического домена. В определенных вариантах осуществления усеченный цитоплазматический домен получают из аминокислот 704-862 SEQ ID NO: 17 (т.е. из цитоплазматического домена молекулы С4 по настоящему изобретению) путем ее усечения после указанной аминокислоты вплоть до С-конца. В предпочтительном варианте осуществления синтетический белок оболочки HIV содержит усеченный цитоплазматический домен, имеющий 1-10 аминокислотных остатков, более предпочтительно 4-8 аминокислотных остатков и наиболее предпочтительно 7 аминокислотных остатков цитоплазматического домена gp41 HIV. Цитоплазматический домен или его фрагмент в синтетическом белке оболочки HIV расположен в направлении С-конца от внеклеточного домена (эктодомена), и в случае, если синтетический белок оболочки HIV также содержит трансмембранный домен, то цитоплазматический домен или его фрагмент расположен в направлении С-конца от трансмембранного домена. См., например, фиг. 1А и 1С. В конкретном варианте осуществления синтетический белок оболочки HIV содержит gp41 с усеченным цитоплазматическим доменом, имеющим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или ее фрагмент, как, например, ее остатки 1-4 (т.е. NRVR). Были описаны и могут применяться другие усеченные цитоплазматические домены (например, Schiernle et al., PNAS 1997; Abrahamyan et al., J. Virol. 2005).

В вариантах осуществления, где синтетический белок оболочки HIV дополнительно содержит трансмембранный домен и фрагмент цитоплазматического домена, предпочтительно, чтобы белок также содержал аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37, которая содержит остатки 655-682 SEQ ID NO: 18, где аминокислотная последовательность под SEQ ID NO: 37 слита с С-концом SEQ ID NO: 8 и N-концом трансмембранного домена.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения синтетический белок оболочки HIV дополнительно содержит трансмембранный домен, как, например, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, и усеченный цитоплазматический домен или фрагмент цитоплазматического домена, как, например, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или остатки 1-4 SEQ ID NO: 14 (т.е. NRVR). Синтетический белок оболочки HIV наиболее предпочтительно содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18 с сигнальной последовательностью (т.е. аминокислотными остатками 1-29 SEQ ID NO: 18) или без нее или состоит из нее.

В другом варианте осуществления синтетический белок оболочки HIV содержит тримеризационный домен, который замещает трансмембранную область Env. Тримеризационный домен увеличивает стабильность тримерной структуры Env. Синтетический белок оболочки HIV предпочтительно содержит полипептид gp140, который модифицирован таким образом, чтобы содержать тримеризационный домен, стабилизирующий тримеры gp140. Примеры тримеризационных доменов включают без ограничения тримеризационный домен "фолдон" фибритина Т4, как, например, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16; суперспиральный тримеризационный домен, полученный из GCN4, как, например, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15; каталитическую

субъединицу аспартаттранскарбамоилазы *E. coli* в качестве метки тримеризации или тримеризационные мотивы матрилина. В случае присутствия тримеризационный домен, как правило, расположен в направлении С-конца от внеклеточного домена (см. фиг. 1B). В определенных предпочтительных вариантах осуществления, где синтетический белок оболочки HIV содержит тримеризационный домен, синтетический белок оболочки HIV содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19 с сигнальной последовательностью (т.е. аминокислотными остатками 1-29 SEQ ID NO: 19) или без нее. Эти варианты осуществления с тримеризационными доменами применимы главным образом для растворимых вариантов эктодоменов синтетического белка оболочки HIV. В определенных вариантах осуществления таких растворимых вариантов по настоящему изобретению участок расщепления фурином можно подвергать мутации (например, мутации по типу замены Lys на Glu в положении 480 в SEQ ID NO: 8) для инактивации этого участка расщепления, вследствие чего белок становится одноцепочечным; что обеспечивает хорошее объединение с тримеризационным доменом, в особенности с тримеризационным доменом GCN4 под SEQ ID NO: 19.

Альтернативные версии таких растворимых вариантов эктодоменов синтетического белка оболочки HIV без применения тримеризационных доменов также являются вариантами осуществления настоящего изобретения, и их можно получить из SEQ ID NO: 8 путем комбинирования мутаций, которые оптимизируют участок расщепления фурином (путем замещения дипептида Gly-Lys в положениях 479-480 четырьмя остатками Arg), а также так называемых мутаций SOSIP (мутации I>P в положении 529 и введения дисульфидного мостика между положениями 471 и 575 путем замещения каждого из соответствующих Ala и Thr в этих положениях в SEQ ID NO: 8 остатком Cys). С помощью этого получают белок, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 со следующей комбинацией мутаций: EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C.

Одна возможная модификация для дополнительного увеличения содержания тримеров в синтетическом белке оболочки HIV по настоящему изобретению (содержащем SEQ ID NO: 8) представляет собой модификацию по типу замены Ile на Pro в положении 529. Это может быть эффективным как для растворимых, так и для мембраносвязанных вариантов.

Векторы.

Другой общий аспект настоящего изобретения относится к векторам, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок оболочки HIV. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения векторы могут содержать любой из синтетических белков оболочки HIV, описанных в данном документе. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19 и более предпочтительно SEQ ID NO: 18.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая синтетический белок оболочки HIV, функционально связана с промотором, что означает, что нуклеиновая кислота находится под контролем промотора. Промотор может представлять собой гомологичный промотор (т.е. полученный из того же генетического источника, что и вектор) или гетерологичный промотор (т.е. полученный из другого вектора или генетического источника). Примеры подходящих промоторов включают промотор цитомегаловируса (CMV) и промотор вируса саркомы Рауса (RSV). Промотор предпочтительно расположен выше нуклеиновой кислоты в кассете экспрессии. Иллюстративная последовательность промотора CMV, которая может быть функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей синтетический белок оболочки HIV, показана под SEQ ID NO: 24.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения вектор может представлять собой вектор экспрессии. Векторы экспрессии включают в себя без ограничения векторы для экспрессии рекомбинантного белка и вектор для доставки нуклеиновой кислоты в организм субъекта для экспрессии в ткани субъекта, как, например, вирусный вектор. Примеры вирусных векторов, подходящих для применения в настоящем изобретении, включают без ограничения аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса, поксвирусные векторы, векторы на основе MVA, энтеровирусные векторы, векторы на основе вируса венесуэльского энцефалита лошадей, векторы на основе вируса леса Семлики, векторы на основе вируса табачной мозаики, лентивирусные векторы и т.д. Вектор также может представлять собой невирусный вектор. Примеры невирусных векторов включают без ограничения плазмиды, искусственные бактериальные хромосомы, искусственные хромосомы дрожжей, бактериофаги и т.д.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения вектор представляет собой аденовирусный вектор. Аденовирус согласно настоящему изобретению принадлежит к семейству *Adenoviridae* и предпочтительно представляет собой аденовирус, принадлежащий к роду *Mastadenovirus*. Он может представлять собой аденовирус человека, а также аденовирус, который инфицирует другие виды, в том числе без ограничения аденовирус крупного рогатого скота (например, аденовирус крупного рогатого скота 3, BAdV3), аденовирус собак (например, CAdV2), аденовирус свиней (например, PAdV3 или 5) или аденовирус обезьян (который включает аденовирус нечеловекообразных обезьян и аденовирус человекообразных обезьян, как, например, аденовирус шимпанзе или аденовирус гориллы). Аденовирус предпочтительно представляет собой аденовирус человека (HAdV или AdHu) или аденовирус обезьян, как,

например, аденовирус шимпанзе или горилл (ChAd, AdCh или SAdV). В настоящем изобретении подразумевается аденовирус человека, если упоминается Ad без указания вида, например, краткое обозначение "Ad26" означает то же, что и *HadV26*, а именно аденовирус человека серотипа 26. Также используемое в данном документе обозначение "rAd" означает рекомбинантный аденовирус, например, "rAd26" относится к рекомбинантному аденовирусу человека серотипа 26.

Наиболее углубленные исследования были проведены с применением аденовирусов человека, и аденовирусы человека являются предпочтительными согласно определенным аспектам настоящего изобретения. В определенных предпочтительных вариантах осуществления в основе рекомбинантного аденовируса согласно настоящему изобретению лежит аденовирус человека. В предпочтительных вариантах осуществления в основе рекомбинантного аденовируса лежит аденовирус человека серотипа 5, 11, 26, 34, 35, 48, 49, 50, 52 и т.д. Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26. Преимуществом данных серотипов является низкое доминирование серотипа и/или низкие титры предсуществующих нейтрализующих антител в популяции человека и опыт применения у субъектов-людей в клинических испытаниях.

Обычно аденовирусы обезьян также характеризуются низким доминированием серотипа и/или низкими титрами предсуществующих нейтрализующих антител в популяции человека, при этом было опубликовано значительное количество работ по применению векторов на основе аденовируса шимпанзе (например, US 6083716; WO 2005/071093; WO 2010/08 6189; 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 обзорную публикацию Bangari and Mittal, 2006, Vaccine 24: 849-62 [72]; и обзорную публикацию Lasago and Ertl, 2009, Mol Ther 17: 1333-39 [73]). Следовательно, в других вариантах осуществления в основе рекомбинантного аденовируса согласно настоящему изобретению лежит аденовирус обезьян, например, аденовирус шимпанзе. В определенных вариантах осуществления в основе рекомбинантного аденовируса лежит аденовирус обезьян 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.

Аденовирусный вектор предпочтительно представляет собой дефектный по репликации рекомбинантный вирусный вектор, такой как rAd26, rAd35, rAd48, rAd5HVR48 и т.д.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения аденовирусные векторы содержат капсидные белки из редких серотипов, в том числе Ad26. В типичном варианте осуществления вектор представляет собой вирус rAd26. "Капсидный белок аденовируса" относится к белку в капсиде аденовируса (например, векторы Ad26, Ad35, rAd48, rAd5HVR48), который участвует в определении серотипа и/или тропизма конкретного аденовируса. Капсидные белки аденовирусов, как правило, включают в себя белки фибера, пентона и/или гексона. Как используется в данном документе, "капсидный белок" конкретного аденовируса, как, например, "капсидный белок Ad26", может представлять собой, например, химерный капсидный белок, который содержит по меньшей мере часть капсидного белка Ad26. В определенных вариантах осуществления капсидный белок представляет собой целый капсидный белок Ad26. В определенных вариантах осуществления гексон, пентон и фибер относятся к Ad26.

Среднему специалисту в данной области будет понятно, что элементы, полученные из нескольких серотипов, можно объединять в одном рекомбинантном аденовирусном векторе. Таким образом можно получить химерный аденовирус, в котором сочетаются требуемые свойства от различных серотипов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в химерном аденовирусе по настоящему изобретению может сочетаться отсутствие предсуществующего иммунитета от первого серотипа с такими характеристиками, как термостабильность, сборка, закрепление, выход при получении, перенаправленная или улучшенная инфекционность, стабильность ДНК в клетке-мишени и т.п.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный аденовирусный вектор, применимый в настоящем изобретении, получен главным образом или полностью из Ad26 (т.е. вектор представляет собой rAd26). В некоторых вариантах осуществления аденовирус является дефектным по репликации, например, ввиду того, что он содержит делецию в области E1 генома. Для аденовирусов, получаемых из аденовируса, не принадлежащего к группе C, такого как Ad26 или Ad35, обычной практикой является замена кодирующей последовательности E4-orf6 аденовируса на E4-orf6 аденовируса характерной для человека подгруппы C, такого как Ad5. Это обеспечивает возможность размножения таких аденовирусов в хорошо известных дополняющих линиях клеток, которые экспрессируют гены E1 Ad5, таких как, например, клетки 293, клетки PER.C6 и т.п. (см., например, Havenga, et al., 2006, J. Gen. Virol. 87: 2135-43; WO 03/104467). Однако такие аденовирусы не смогут реплицироваться в недополняющих клетках, которые не экспрессируют гены E1 Ad5.

Получение рекомбинантных аденовирусных векторов хорошо известно из уровня техники. Получение векторов на основе rAd26 описано, например, в WO 2007/104792 и в Abbink et al., (2007) Virol. 81(9): 4654-63. Иллюстративные последовательности генома Ad26 находятся в GenBank под номером доступа EF 153474 и под SEQ ID NO: 1 в WO 2007/104792. Примеры векторов, применимых в настоящем изобретении, включают, например, векторы, описанные в WO 2012/082918, раскрытие которого включено в

данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Как правило, вектор, применимый в настоящем изобретении, получают с применением нуклеиновой кислоты, содержащей целый геном рекомбинантного аденовируса (например, плазмиды, космиды или бакуловирусного вектора). Таким образом, в настоящем изобретении также представлены выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют аденовирусные векторы по настоящему изобретению. Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут быть в форме РНК или в форме ДНК, полученной путем клонирования или полученной синтетическим путем. ДНК может быть двухнитевой или одонитевой.

Аденовирусные векторы, применимые в настоящем изобретении, как правило, являются дефектными по репликации. В этих вариантах осуществления вирус делают дефектным по репликации путем делеции или инактивации областей, критически важных для репликации вируса, таких как область E1. Области могут быть в значительной степени подвергнуты делеции или инактивации, например, посредством вставки гена, представляющего интерес, такого как ген, кодирующий синтетический белок оболочки HIV (обычно связанный с промотором), или ген, кодирующий антигенный полипептид HIV (обычно связанный с промотором), в данную область. В некоторых вариантах осуществления векторы по настоящему изобретению могут содержать делеции в других областях, таких как области E2, E3 или E4, или вставки гетерологичных генов, связанных с промотором, в одной или нескольких из этих областей. В случае аденовирусов с мутацией в E2 или E4 для получения рекомбинантных аденовирусов обычно применяют линии клеток, дополняющие E2 и/или E4. Мутации в области E3 аденовируса не обязательно должны дополняться линией клеток, поскольку E3 не требуется для репликации.

Пакующую линию клеток, как правило, применяют для получения достаточных количеств аденовирусных векторов для применения в настоящем изобретении. Пакующая клетка представляет собой клетку, которая содержит те гены, которые были подвергнуты делеции или инактивации в дефектном по репликации векторе, что, тем самым, позволяет вирусу реплицироваться в клетке. Подходящие пакующие линии клеток для аденовирусов с делецией в области E1 включают в себя, например, PER.C6, 911, 293 и A549-E1.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения и как отмечалось выше, любой из синтетических белков оболочки HIV, описанных в данном документе, может экспрессироваться в векторах по настоящему изобретению. Ввиду вырожденности генетического кода специалисту в данной области хорошо известно, что можно сконструировать несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, которые кодируют один и тот же белок, согласно способам, полностью соответствующим установленной практике в данной области. Нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок оболочки HIV, можно необязательно подвергнуть оптимизации кодонов для обеспечения надлежащей экспрессии в организме обрабатываемого хозяина (например, человека). Оптимизация кодонов представляет собой технологию, широко применяемую в данной области техники. Некоторые неограничивающие примеры последовательностей, кодирующих синтетический белок оболочки HIV по настоящему изобретению, представлены под SEQ ID NO: 25, 26 и 27. Как правило, нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок оболочки HIV, клонируют в область E1 и/или E3 генома аденовируса.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вектор представляет собой аденовирусный вектор и более предпочтительно вектор на основе rAd26, наиболее предпочтительно вектор на основе rAd26, по меньшей мере, с делецией в области E1 генома аденовируса, например, такой как описанный в Abbink, J. Virol., 2007. 81(9): p. 4654-63, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В настоящем изобретении также представлены клетки, предпочтительно выделенные клетки, содержащие любой из векторов, описанных в данном документе. Клетки можно применять для получения рекомбинантного белка или для получения вирусных частиц.

Таким образом, варианты осуществления настоящего изобретения также относятся к способу получения синтетического антигенного полипептида HIV. Способ включает осуществление трансфекции клетки-хозяина вектором экспрессии, содержащим нуклеиновую кислоту, которая кодирует синтетический антигенный полипептид HIV, функционально связанную с промотором, выращивание трансфицированной клетки в условиях, подходящих для экспрессии синтетического антигенного полипептида HIV, и выделение синтетического антигенного полипептида HIV из клетки.

Синтетический антигенный полипептид HIV можно выделять или собирать из клетки с помощью любого известного из уровня техники способа, в том числе аффинной хроматографии и т.д. Методики, применяемые для экспрессии рекомбинантного белка, будут хорошо известны среднему специалисту в данной области в свете настоящего раскрытия.

Настоящее изобретение также включает способ получения вектора, кодирующего синтетический антигенный полипептид HIV по настоящему изобретению, при этом способ включает культивирование клетки, содержащей вектор, с размножением и увеличением числа копий вектора в ходе указанного культивирования, и выделение вектора, кодирующего синтетический антигенный полипептид HIV по настоящему изобретению, из культуры клеток, например из клеток, из культуральной среды или их обоих. Вектор можно дополнительно очищать согласно способам, известным из уровня техники.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен вектор согласно варианту осуществления настоящего изобретения, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический антигенный полипептид HIV, и в определенных иллюстративных вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26 и 27.

Композиции.

В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок оболочки HIV, и носитель. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения любой из векторов, описанных в данном документе, может быть включен в композицию. Вектор предпочтительно представляет собой вирусный вектор, более предпочтительно аденовирусный вектор и еще более предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26. В предпочтительном варианте осуществления композиция содержит аденовирусный вектор, предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26, кодирующий синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19 и более предпочтительно аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

В одном аспекте в настоящем изобретении представлена комбинированная вакцина, содержащая один или несколько векторов вместе, содержащих последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие (i) синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 (например, SEQ ID NO: 18 или 19), и (ii) второй белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5. Каждый из векторов может находиться в отдельной композиции, или они могут быть объединены в одну композицию. Предполагается, что обе нуклеиновые кислоты в векторе(векторах) будут вводить одному субъекту, что будет приводить в результате к иммунному ответу на HIV более широкого спектра, чем иммунный ответ, который получили бы при введении любого вектора в отдельности. Обе последовательности нуклеиновой кислоты также могут находиться в одном отдельном векторе.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения композиция содержит иммуногенно эффективное количество вектора, такого как вирусный вектор. Как используется в данном документе, "иммуногенно эффективное количество" или "иммунологически эффективное количество" означает количество композиции, достаточное для индукции требуемого иммунного эффекта или иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом. В одном варианте осуществления иммуногенно эффективное количество означает количество, достаточное для индукции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом. В другом варианте осуществления иммуногенно эффективное количество означает количество, достаточное для обеспечения выработки иммунитета у субъекта, нуждающегося в этом, например обеспечения защитного эффекта против заболевания, такого как вирусная инфекция. Иммуногенно эффективное количество может варьироваться в зависимости от ряда факторов, таких как физическое состояние субъекта, возраст, вес, состояние здоровья и т.д.; конкретное применение, будь-то индукция иммунного ответа или обеспечение защитного иммунитета; конкретный вводимый рекомбинантный вектор; иммуноген или антигенный полипептид, кодируемый вводимым рекомбинантным вектором; конкретный вводимый антигенный полипептид и конкретное заболевание, например вирусная инфекция, против которой требуется выработка иммунитета. Средний специалист в данной области может с легкостью определить иммуногенно эффективное количество в свете настоящего раскрытия.

В качестве общего указания иммуногенно эффективное количество при использовании в отношении рекомбинантного вирусного вектора, такого как аденовирусный вектор, может находиться в диапазоне от приблизительно 10⁸ вирусных частиц до приблизительно 10¹² вирусных частиц, например составлять 10⁸, 10⁹, 10¹⁰, 10¹¹ или 10¹² вирусных частиц. Иммуногенно эффективное количество можно вводить в одной композиции или в нескольких композициях, как, например, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 композициях (например, таблетках, капсулах или инъекционных препаратах), при этом введение нескольких капсул или инъекций в совокупности обеспечивает для субъекта иммуногенно эффективное количество. В большинстве случаев при использовании в отношении полипептида, такого как выделенный антигенный полипептид, иммуногенно эффективное количество может находиться в диапазоне, например, от приблизительно 0,3 до приблизительно 3000 мкг, например 1-1000 мкг, например 10-500 мкг, например, составлять приблизительно 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 мкг. В качестве неограничивающего примера можно комбинировать введение вектора, кодирующего синтетический антиген Env HIV по настоящему изобретению (имеющий SEQ ID NO: 8), с введением полипептида Env, например, 250 мкг тримерного белка Env HIV клады С, имеющего аминокислоты 30-708 SEQ ID NO: 7. Также возможно вводить субъекту иммуногенно эффективное количество с последующим введением тому же субъекту другой дозы в иммуногенно эффективном количестве по так называемой схеме прайм-буст. Данная общая концепция схемы прайм-буст хорошо известна специалисту в области вакцинологии. При необходимости в схему можно необязательно добавлять дополнительные введения бустерных доз.

Композиции по настоящему изобретению дополнительно содержат носитель. Носитель может включать в себя один или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, таких как связывающие вещества, разрыхлители, вещества, способствующие набуханию, суспендирующие средст-

ва, эмульгирующие средства, смачивающие средства, смазывающие вещества, ароматизаторы, подсластители, консерванты, красители, солюбилизаторы и покрытия. Конкретная природа носителя или другого материала может зависеть от пути введения, например, внутримышечного, подкожного, перорального, внутривенного, чрескожного, чресслизистого (например, в кишечнике), интраназального или интратрахеального путей. В случае жидких инъекционных препаратов, например суспензий и растворов, подходящие носители и добавки включают в себя воду, гликоли, масла, спирты, консерванты, красящие средства и т.п. В случае твердых препаратов для перорального введения, например порошков, капсул, капсуловидных таблеток, желатиновых капсул и таблеток, подходящие носители и добавки включают в себя разновидности крахмала, сахара, разбавители, гранулирующие средства, смазывающие вещества, связывающие вещества, разрыхлители и т.п. В случае назальных спреев/смесей для ингаляции водный раствор/суспензия может содержать воду, гликоли, масла, смягчающие вещества, стабилизаторы, смачивающие средства, консерванты, душистые вещества, вкусоароматические добавки и т.п. в качестве подходящих носителей и добавок.

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

Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения композиция содержит иммуногенно эффективное количество очищенного или частично очищенного аденовирусного вектора, такого как вектор на основе аденовируса серотипа 26, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок оболочки HIV по настоящему изобретению. Указанные композиции можно составлять в виде вакцины (также называемой в данном документе "иммуногенной композицией") согласно способам, хорошо известным из уровня техники.

Композиции по настоящему изобретению могут необязательно дополнительно содержать адъювант для усиления иммунных ответов. Термины "адъювант" и "иммуностимулятор" используются в данном документе взаимозаменяемо и их определяют как одно или несколько веществ, вызывающих стимуляцию иммунной системы. В данном контексте адъювант применяют для усиления иммунного ответа на векторы, кодирующие синтетические белки оболочки HIV по настоящему изобретению и/или антигенные полипептиды HIV, применяемые в комбинации с векторами, кодирующими синтетические белки оболочки HIV по настоящему изобретению.

Адъюванты, подходящие для применения в настоящем изобретении, должны быть потенциально безопасными, хорошо переносимыми и эффективными у людей, такими как, например, 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), Adjuvlex и MF59. Оптимальные доли каждого компонента в составе можно определить с помощью методик, хорошо известных специалистам в данной области в свете настоящего раскрытия.

В предпочтительном варианте осуществления адъювант представляет собой соль алюминия, такую как AdjuPhos.

Получение и применение иммуногенных композиций хорошо известно средним специалистам в данной области. Жидкие фармацевтические композиции обычно содержат жидкий носитель, такой как вода, вазелин, масла животного или растительного происхождения, минеральное масло или синтетическое масло. Также могут быть включены физиологический солевой раствор, раствор декстрозы или другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

Например, рекомбинантный аденовирусный вектор можно хранить в буфере, который также применяют для международного стандарта аденовируса (Hoganson et al., 2002, *Bioprocessing J.* 1: 43-8): 20 mM Tris с pH 8, 25 mM NaCl, 2,5% глицерин. Другой применимый буфер для составления аденовируса, подходящий для введения людям, представляет собой 20 mM Tris, 2 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, 10% вес./об., сахарозы, 0,02% вес./об., полисорбата-80. Другой буфер для составления, который подходит для рекомбинантного аденовируса, содержит 10-25 mM цитратного буфера с pH 5,9-6,2, 4-6% (вес./вес.) гидроксипропил-β-циклодекстрина (HBCD), 70-100 mM NaCl, 0,018-0,035% (вес./вес.) полисорбата-80 и необязательно 0,3-0,45% (вес./вес.) этанола. Безусловно, можно применять множество других буферов, при этом известны некоторые примеры подходящих составов для хранения и для фармацевтического введения очищенных векторов.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения композицию по настоящему изобретению можно применять вместе с одним или несколькими дополнительными векторами, кодирующими один или несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV, и/или одним или несколькими выделенными антигенными полипептидами HIV. Дополнительные векторы и/или антигенные полипептиды

HIV могут находиться в той же композиции, содержащей синтетический белок Env HIV по настоящему изобретению. Они также могут находиться в одной или нескольких других композициях, которые можно применять вместе с композицией, содержащей синтетический белок Env HIV по настоящему изобретению, в виде вакцинной комбинации. Один или несколько дополнительных векторов предпочтительно представляют собой вирусные векторы, такие как аденовирусные векторы, и наиболее предпочтительно представляют собой векторы на основе аденовируса серотипа 26. Один или несколько дополнительных векторов могут кодировать любой антигенный полипептид HIV, известный специалистам в данной области в свете настоящего раскрытия.

В одном варианте осуществления композиция или вакцинная комбинация дополнительно содержит второй аденовирусный вектор, предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26, кодирующий антигенный полипептид HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5. Преимуществом таких вариантов осуществления является увеличенный спектр иммунного ответа (охватывающий штаммы из клад В и С).

В другом варианте осуществления композиция или вакцинная комбинация по настоящему изобретению дополнительно содержит аденовирусный вектор, предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26, кодирующий антигенный полипептид HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28 (mos1GagPol).

В другом варианте осуществления композиция или вакцинная комбинация по настоящему изобретению дополнительно содержит аденовирусный вектор, предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26, кодирующий антигенный полипептид HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29 (mos2GagPol).

В конкретном варианте осуществления композиция или вакцинная комбинация по настоящему изобретению дополнительно содержит второй аденовирусный вектор, предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26, кодирующий антигенный полипептид HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и один или несколько дополнительных аденовирусных векторов, предпочтительно векторов на основе аденовируса серотипа 26, кодирующих один или несколько антигенных полипептидов HIV, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29. Например, композиция или вакцинная комбинация согласно варианту осуществления настоящего изобретения может содержать четыре аденовирусных вектора, предпочтительно векторы на основе аденовируса серотипа 26, при этом первый вектор кодирует синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 (например, SEQ ID NO: 18); второй вектор кодирует антигенный полипептид HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; третий вектор кодирует синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28; и четвертый вектор кодирует синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах осуществления композиция или вакцинная комбинация дополнительно содержит один или несколько выделенных антигенных полипептидов HIV. В композицию или вакцинную комбинацию по настоящему изобретению можно дополнительно включать любой антигенный полипептид HIV, известный специалистам в данной области в свете настоящего раскрытия, в том числе без ограничения белок оболочки HIV (например, gp160, gp140, gp120 или gp41), предпочтительно стабилизированный тримерный белок gp140, такой как стабилизированный белок gp140 из кланды С или кланды А. В предпочтительном варианте осуществления выделенный антигенный полипептид HIV представляет собой стабилизированный тримерный белок gp140 HIV кланды С, как, например, содержащий остатки 30-708 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 (остатки 1-29 SEQ ID NO: 7 находятся в сигнальной последовательности). Альтернативный или дополнительный полипептид Env HIV, который можно применять в дополнение к белку gp140 из кланды С или в отдельности, представляет собой мозаичный тримерный белок Env, например, имеющий аминокислотную последовательность, раскрытую аминокислотами 30-724 под SEQ ID NO: 36 (соответствующую SEQ ID NO: 2 из WO 2014/107744, остатки 1-29 SEQ ID NO: 36 находятся в сигнальной последовательности).

Согласно конкретному варианту осуществления настоящего изобретения антигенный белок HIV может представлять собой синтетический белок оболочки HIV по настоящему изобретению. Таким образом, синтетический белок оболочки по настоящему изобретению можно применять в выделенной и/или очищенной форме для индукции иммунного ответа или обеспечения защитного иммунитета и т.д. против HIV у субъекта, нуждающегося в этом. Любой из описанных в данном документе синтетических белков оболочки, содержащих аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, можно применять в качестве антигенного белка HIV в выделенной и/или очищенной форме. В предпочтительном варианте осуществления в случае применения в выделенной форме в качестве антигенного белка HIV синтетический белок оболочки содержит остатки 30-711 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 18 или остатки 30-686 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 19 и более предпочтительно остатки 30-704 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 18. Выделенный антигенный полипептид HIV также может содержать SEQ ID NO: 8 со следующими мутациями: EK479-480RRRR, I529P,

A471C и T575C.

Варианты осуществления настоящего изобретения также относятся к композициям или вакцинным комбинациям, содержащим выделенный синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8. Можно применять любой из синтетических белков оболочки HIV, описанных в данном документе. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения выделенный синтетический белок оболочки HIV содержит остатки 30-704 или 30-711 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 18, остатки 30-686 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 19 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 со следующими мутациями: EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C. Такие композиции или вакцинные комбинации могут дополнительно содержать один или несколько векторов экспрессии, например аденовирусных векторов, таких как векторы на основе аденовируса серотипа 26, кодирующих один или несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV, таких как синтетические белки оболочки HIV по настоящему изобретению, или другие антигенные белки HIV, как, например, приведенные под SEQ ID NO: 4, 5, 7, 28 или 29, или их фрагменты.

Настоящее изобретение также относится к способу получения композиции или вакцинной комбинации по настоящему изобретению. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения способ получения композиции или комбинации включает объединение вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок оболочки HIV по настоящему изобретению, с носителем и необязательно одним или несколькими дополнительными векторами, кодирующими один или несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV, и/или одним или несколькими выделенными антигенными полипептидами HIV. Среднему специалисту в данной области будут хорошо известны традиционные методики, применяемые для получения таких композиций.

Вакцина и вакцинные комбинации.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения композиция может представлять собой вакцину. Используемый в данном документе термин "вакцина" относится к композиции, содержащей вектор экспрессии, предпочтительно вирусный вектор, кодирующий синтетический белок оболочки HIV по настоящему изобретению, которая может обеспечивать защитный иммунитет или защитный иммунный ответ у субъекта или применяться для вакцинации субъекта. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения после введения композиции субъекту вектор экспрессии экспрессирует кодируемый синтетический белок оболочки HIV, и экспрессируемый синтетический белок оболочки HIV презентуется иммунной системе субъекта, индуцируя тем самым требуемый ответ с выработкой иммунитета или индукцией иммунного ответа.

Таким образом, в другом общем аспекте в настоящем изобретении представлена вакцина для индукции иммунного ответа на вирус иммунодефицита человека (HIV) у субъекта. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения вакцина содержит композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество вектора экспрессии, кодирующего синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 и предпочтительно аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18. Вектор экспрессии предпочтительно представляет собой вирусный вектор, более предпочтительно аденовирусный вектор и наиболее предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения "индукция иммунного ответа" при использовании в отношении способов и композиций, описанных в данном документе, охватывает обеспечение защитного иммунитета и/или вакцинацию субъекта от инфекции, такой как инфекция, вызываемая HIV, в профилактических целях, а также вызывание у субъекта, нуждающегося в этом, требуемого иммунного ответа или эффекта против инфекции, такой как инфекция, вызываемая HIV, в терапевтических целях. Способы по настоящему изобретению предпочтительно предназначены для профилактических целей, как, например, для обеспечения защитного иммунитета. Иммунный ответ может представлять собой клеточный иммунный ответ и/или гуморальный иммунный ответ.

Используемый в данном документе термин "защитный иммунитет" или "защитный иммунный ответ" означает, что вакцинированный субъект в состоянии контролировать инфекцию, вызываемую патогенным возбудителем, от которой была проведена вакцинация. Обычно у субъекта, у которого выработался "защитный иммунный ответ", развиваются клинические симптомы только от легкой до умеренной степени тяжести или симптомы вовсе не развиваются. Обычно субъект, имеющий "защитный иммунный ответ" на определенного возбудителя или "защитный иммунитет" к нему, не умирает в результате инфицирования указанным возбудителем.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения вакцинные композиции могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных векторов, например вирусных векторов, таких как аденовирусные векторы, предпочтительно векторы на основе аденовируса серотипа 26, кодирующих один или несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV, и/или один или несколько выделенных антигенных полипептидов HIV. Синтетический белок оболочки HIV, дополнительные векторы и/или один или несколько выделенных антигенных полипептидов HIV можно составлять в одной и той же композиции или в одной или нескольких разных композициях в вакцине.

Настоящее изобретение также относится к вакцинным комбинациям для примирования и усиления иммунного ответа на HIV из одной или нескольких клад у субъекта, нуждающегося в этом, с помощью одного или нескольких векторов в комбинации с выделенным антигенным полипептидом. Таким образом, в другом общем аспекте в настоящем изобретении представлена вакцинная комбинация для индукции иммунного ответа на HIV у субъекта. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения вакцинная комбинация содержит:

(i) первую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество вектора экспрессии, кодирующего синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 8, имеющую одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из (a) I529P, (b) K480E и (c) комбинации EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C, и носитель;

и

(ii) вторую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида HIV и носитель,

где одна из первой и второй композиций предназначена для примиряющей иммунизации, а другая композиция предназначена для бустерной иммунизации.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения вакцинная комбинация необязательно дополнительно содержит иммуногенно эффективное количество одного или нескольких дополнительных векторов экспрессии, кодирующих один или несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV. Один или несколько дополнительных векторов экспрессии могут быть включены в первую композицию или вторую композицию, или один или несколько дополнительных векторов экспрессии могут быть включены в одну или несколько дополнительных композиций, подлежащих введению вместе с первой и/или второй композицией.

Используемые в данном документе термины "совместная доставка", "совместное введение" или "введение вместе друг с другом" относятся к одновременному введению двух или более компонентов, как, например, вирусного вектора экспрессии и выделенного антигенного полипептида или нескольких вирусных векторов экспрессии. "Одновременное введение" может представлять собой введение двух или более компонентов по меньшей мере в один и тот же день. Если два компонента "вводят вместе друг с другом", то их можно вводить в отдельных композициях последовательно в пределах короткого промежутка времени, такого как 24, 20, 16, 12, 8 или 4 ч, или в пределах 1 ч или меньше, или их можно вводить в одной композиции в одно и то же время.

В конкретных вариантах осуществления вакцинной комбинации по настоящему изобретению первая композиция содержит аденовирусный вектор, предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26, кодирующий синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18; и при этом выделенный антигенный полипептид HIV содержит остатки 30-708 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 или остатки 30-724 SEQ ID NO: 36. В одном конкретном варианте осуществления первая композиция дополнительно содержит аденовирусный вектор, предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26, кодирующий антигенный полипептид HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5. В другом конкретном варианте осуществления первая композиция дополнительно содержит один или несколько дополнительных аденовирусных векторов, предпочтительно векторов на основе аденовируса серотипа 26, кодирующих один или несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28 и 29.

Другой общий аспект настоящего изобретения относится к набору, содержащему вакцинную комбинацию согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

Другие варианты осуществления синтетического белка оболочки HIV, векторов экспрессии, дополнительных векторов экспрессии, антигенных полипептидов HIV, кодируемых векторами экспрессии, и выделенного антигенного полипептида HIV и т.д., которые можно применять в вакцинных комбинациях по настоящему изобретению, подробно обсуждаются выше и в иллюстративных примерах ниже.

Способ индукции защитного иммунитета к инфекции, вызываемой HIV.

Настоящее изобретение также относится к способу индукции иммунного ответа на HIV из одной или нескольких клад у субъекта, нуждающегося в этом. Способы, описанные в данном документе, включают способы примирования и усиления иммунного ответа с помощью одного или нескольких векторов экспрессии в комбинации с одним или несколькими выделенными антигенными полипептидами.

В одном общем аспекте способ индукции иммунного ответа на вирус иммунодефицита человека (HIV) у субъекта включает введение субъекту композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество вектора экспрессии, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8. Любую из композиций, описанных в данном документе, можно применять в способе индукции иммунного ответа на HIV у субъекта. Композиция предпочтительно содержит аденовирусный вектор, предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18. Композиция может дополнительно содержать один или несколько дополнительных векторов, кодирующих один или

несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV, и/или один или несколько дополнительных выделенных антигенных полипептидов HIV.

В другом общем аспекте способ индукции иммунного ответа на вирус иммунодефицита человека (HIV) у субъекта включает:

(i) введение субъекту первой композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество вектора экспрессии, кодирующего мозаичный белок оболочки HIV, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 8, имеющую одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из (a) I529P, (b) K480E и (c) комбинации EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C, и носитель;

(ii) введение субъекту второй композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида HIV и носитель; и

(iii) необязательно введение субъекту иммуногенно эффективного количества одного или нескольких дополнительных векторов экспрессии, кодирующих один или несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV,

где стадии (i) и (ii) выполняют в любом порядке, при этом одна из стадий предназначена для примирившей иммунизации, а другая стадия для бустерной иммунизации. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения необязательное эффективное количество одного или нескольких дополнительных векторов экспрессии вводят вместе с первой композицией или второй композицией. В предпочтительном варианте осуществления необязательное эффективное количество одного или нескольких дополнительных векторов экспрессии вводят вместе с первой композицией.

В конкретном варианте осуществления способа индукции иммунного ответа первая композиция содержит аденовирусный вектор, предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26, кодирующий синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, и второй аденовирусный вектор, предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26, кодирующий антигенный полипептид HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; вторая композиция содержит выделенный антигенный полипептид HIV, имеющий остатки 30-708 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 или остатки 30-724 SEQ ID NO: 36; и один или несколько дополнительных векторов экспрессии представляют собой аденовирусные векторы, предпочтительно векторы на основе аденовируса серотипа 26, кодирующие один или несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28 и 29; где первую композицию вводят субъекту вместе с одним или несколькими дополнительными векторами экспрессии один или несколько раз в целях примирившей иммунизации, а вторую композицию вводят субъекту один или несколько раз в целях бустерной иммунизации.

Введение иммуногенных композиций, содержащих векторы экспрессии и/или антигенные полипептиды, как правило, является внутримышечным, внутрикожным или подкожным. Однако также могут предусматриваться другие способы введения, такие как внутривенный, ректальный, чрескожный, пероральный, назальный и т.д. Внутримышечное введение иммуногенных композиций можно осуществлять с помощью иглы для инъекции суспензии векторов экспрессии, например аденовирусных векторов, и/или антигенных полипептидов. Альтернативой является применение безыгольного инъекционного устройства для введения композиции (с помощью, например, Biojector™) или лиофилизованного порошка, содержащего вакцину.

В случае внутримышечной, внутривенной, чрескожной или подкожной инъекции или инъекции в участок поражения вектор будет находиться в форме парентерально приемлемого водного раствора, который является апирогенным и имеет подходящие значение pH, изотоничность и стабильность. Аналогично, выделенный антигенный полипептид будет находиться в форме парентерально приемлемого раствора, имеющего подходящие значение pH, изотоничность и стабильность. Средние специалисты в данной области вполне способны получить подходящие растворы с применением, например, изотонических основ, таких как раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, раствор Рингера с лактатом для инъекций. При необходимости можно включать консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки. Также можно использовать состав с замедленным высвобождением.

Как правило, введение вакцинных композиций согласно вариантам осуществления настоящего изобретения будет иметь профилактическую цель, заключающуюся в формировании иммунного ответа на антиген HIV до инфицирования или развития симптомов. В других вариантах осуществления векторы экспрессии, например аденовирусные векторы и/или антигенные полипептиды HIV можно вводить для постконтактной профилактики.

Иммуногенные композиции, содержащие векторы экспрессии, например аденовирусные векторы, и/или антигенные полипептиды, вводят субъекту, порождая у субъекта иммунный ответ на HIV. Количество композиции, достаточное для индукции выявляемого иммунного ответа, определяется как "иммуногенно эффективная доза" или "иммуногенно эффективное количество". В типичном варианте осуществления настоящего изобретения иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ.

Фактическое вводимое количество, а также частота и продолжительность введения будут зависеть

от природы и тяжести явления, подлежащего лечению. Назначение лечения, например принятие решений относительно дозировки и т.д., находится в пределах сферы ответственности врачей общей практики и других врачей или ветеринара в случае ветеринарной практики, и при этом, как правило, учитываются подлежащее лечению нарушение, состояние отдельного пациента, участок доставки, способ введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Примеры методик и протоколов, упоминаемых выше, можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed., 1980.

После получения аденовирусных векторов и необязательного составления таких частиц в виде композиций векторы можно вводить индивидууму, в частности человеку или другому примату. Доставка отличному от человека млекопитающему не обязательно может предназначаться для терапевтической цели, а может предназначаться для применения в рамках эксперимента, например, при изучении механизмов иммунных ответов на синтетический белок оболочки HIV, экспрессируемый аденовирусными векторами по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления раскрытых способов один или несколько аденовирусных векторов, кодирующих один или несколько антигенных полипептидов HIV, применяют для примирования иммунного ответа. Один или несколько выделенных антигенных полипептидов HIV можно применять вместе с одним или несколькими аденовирусными векторами для примиряющей иммунизации. Примиряющую иммунизацию можно осуществлять только один раз, но также можно необязательно осуществлять несколько раз, например, с начальным примиряющим введением в момент времени 0 и последующим другим примиряющим введением через приблизительно 4-14 недель, например через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 недель или в любое время в данном диапазоне, после начального примиряющего введения. Один или несколько выделенных антигенных полипептидов HIV необязательно вместе с одним или несколькими дополнительными аденовирусами или другими векторами, кодирующими один или несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV, можно применять для усиления иммунного ответа. Бустерную иммунизацию также можно осуществлять один раз или несколько раз, например, в первый раз через приблизительно 18-36 недель, например через 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 недель или в любое время в данном диапазоне, после начального примиряющего введения с последующим другим бустерным введением через приблизительно 36-52 недели, например через 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60 недель или в любое время в данном диапазоне, после начального примиряющего введения. Иммунный ответ, индуцируемый с помощью иммунизации, отслеживают.

Варианты осуществления раскрытых способов также предусматривают более короткие схемы прайм-буст, что означает, что заключительную бустерную иммунизацию осуществляют через приблизительно 22-26 недель после начального примиряющего введения. Примиряющую иммунизацию можно осуществлять в неделю 0. Бустерную иммунизацию можно осуществлять несколько раз, например, в первый раз через приблизительно 7-9 недель или 11-13 недель или через приблизительно 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 недель или в любое время в данном диапазоне после начального примиряющего введения с последующим другим бустерным введением через приблизительно 22-26 недель или через приблизительно 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 недель или в любое время в данном диапазоне после начального примиряющего введения. В определенных вариантах осуществления один или несколько выделенных антигенных полипептидов HIV вводят вместе с одним или несколькими аденовирусными векторами для примиряющей и/или бустерной иммунизации.

Специалистам в данной области легко понятно, что схему примиряющих и бустерных введений можно корректировать на основании измеренных иммунных ответов после введений. Например, бустерные композиции обычно вводят через несколько недель или месяцев после введения примиряющей композиции, например через приблизительно 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 один-два года после введения примиряющей композиции.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения адъювант можно вводить вместе с выделенным антигенным полипептидом HIV в качестве части примиряющей и/или бустерной иммунизации. Любой адъювант можно применять в свете настоящего раскрытия, и в определенных вариантах осуществления адъювант представляет собой соль алюминия, такую как AdjuPhos.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения аденовирусные векторы, применяемые в способах, раскрытых в данном документе, включают в себя вектор на основе гAd26. Предпочтительно вектор на основе гAd26, кодирующий синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19, наиболее предпочтительно SEQ ID NO: 18, применяют для примирования иммунного ответа в отдельности или в комбинации с одним или несколькими дополнительными векторами на основе гAd26, кодирующими один или несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV, как, например, mos1Env, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, а выделенный антигенный полипептид HIV, как, например, содержащий остатки 30-708 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 или остатки 30-724 SEQ ID NO: 36, применяют для усиления иммунного ответа, или наоборот.

В одном иллюстративном варианте осуществления вектор на основе гAd26, кодирующий синтети-

ческий белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, применяют для примирования иммунного ответа в комбинации с вектором на основе гAd26, кодирующим антигенный полипептид HIV, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5. Один или несколько дополнительных векторов на основе гAd26, кодирующих один или несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV, имеющих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4, 28 и 29, также можно вводить вместе с другими векторами на основе гAd26 для примирования иммунного ответа. Примирующее введение в определенных вариантах осуществления осуществляют два раза перед осуществлением какой-либо бустерной иммунизации. Выделенный антигенный полипептид HIV, как, например, содержащий остатки 30-708 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 (предпочтительно) или содержащий остатки 30-724 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 36, или комбинацию по меньшей мере двух таких выделенных антигенных полипептидов HIV затем вводят для усиления иммунного ответа, и их предпочтительно вводят более одного раза. При бустерной иммунизации вместе с выделенным антигенным полипептидом HIV предпочтительно дополнительно вводят адьювант.

В конкретном варианте осуществления иммунный ответ примируют путем введения четырех антигенов HIV, кодируемых аденовирусными векторами, предпочтительно векторами на основе гAd26, при этом четыре кодируемых антигена представляют собой:

(i) синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18,

(ii) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5,

(iii) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28, и

(iv) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29.

Каждый из этих четырех антигенов может кодироваться отдельным аденовирусным вектором, предпочтительно вектором на основе гAd26, который вводят в общей дозе, составляющей приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10×10^{10} вирусных частиц (vp), например приблизительно 5×10^{10} vp (для всех векторов вместе). Векторы можно предварительно смешивать, например, в соотношении 1:1:1:1. Примирующее введение можно повторять после начального примирующего введения, например, через 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 недель после начального примирующего введения. В данном варианте осуществления иммунный ответ усиливают путем введения той же вакцины на основе аденовирусного вектора, применяемой для примирующего введения, вместе с выделенным белком gp140 Env HIV, например, белком gp140 из клады C (содержащим остатки 30-708 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7), или мозаичным белком gp140 (содержащим остатки 30-724 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 36), или белком gp140 из клады C и мозаичным белком gp140 в общей дозе, составляющей приблизительно 50-300 мкг белка, например 50, 100, 150, 200, 250 или 300 мкг или любое количество в данном диапазоне, для белка gp140 из клады C, или, например, 50, 100, 150, 200, 250 или 300 мкг или любое количество в данном диапазоне для мозаичного белка gp140, или, например, 50, 100, 150, 200, 250 или 300 мкг или любое количество в данном диапазоне для комбинации белка gp140 из клады C и мозаичного белка gp140 (например, в соотношении 1:1 при смешивании друг с другом либо введении по отдельности). Белок gp140 предпочтительно вводят вместе с адьювантом, например фосфатом алюминия. Введение аденовируса вместе с белком gp140 для усиления иммунного ответа можно осуществлять через приблизительно 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 недель или в любое время в данном диапазоне после начального примирующего введения. Бустерное введение можно повторять, например, через приблизительно 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 или 54 недели или в любое время в данном диапазоне после начального примирующего введения. Все введения согласно данному варианту осуществления предпочтительно осуществляют посредством внутримышечного пути.

Варианты осуществления

Вариант осуществления 1 представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 8, имеющую одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из (i) I529P, (ii) K480E и (iii) комбинации EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C.

Вариант осуществления 2 представляет собой нуклеиновую кислоту согласно варианту осуществления 1, где синтетический белок оболочки HIV дополнительно содержит сигнальную последовательность, например сигнальную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9-12, предпочтительно SEQ ID NO: 9.

Вариант осуществления 3 представляет собой нуклеиновую кислоту согласно варианту осуществления 1 или 2, где синтетический белок оболочки HIV дополнительно содержит трансмембранный домен, например трансмембранный домен, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, и синтетический белок оболочки HIV предпочтительно дополнительно содержит SEQ ID NO: 37, слитую с С-концом SEQ ID NO: 8 и N-концом трансмембранного домена.

Вариант осуществления 4 представляет собой нуклеиновую кислоту согласно варианту осуществления 3, где синтетический белок оболочки HIV дополнительно содержит фрагмент цитоплазматического домена, предпочтительно фрагмент цитоплазматического домена, содержащий аминокислотную по-

следовательность под SEQ ID NO: 14 или ее аминокислотные остатки 1-4 (т.е. NRVR).

Вариант осуществления 5 представляет собой нуклеиновую кислоту по любому из предыдущих вариантов осуществления 1-4, где синтетический белок оболочки HIV содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 6 представляет собой нуклеиновую кислоту согласно варианту осуществления 1 или 2, где синтетический белок оболочки HIV (а) дополнительно содержит тримеризационный домен, выбранный из группы, состоящей из GCN4, фибритина (домена фолдон), например тримеризационный домен, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16, предпочтительно SEQ ID NO: 15, либо (b) содержит SEQ ID NO: 8 с комбинацией следующих мутаций: EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C.

Вариант осуществления 7 представляет собой нуклеиновую кислоту согласно варианту осуществления 6, где синтетический белок оболочки HIV содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19.

Вариант осуществления 8 представляет собой нуклеиновую кислоту согласно варианту осуществления 5, где синтетический белок оболочки HIV состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 9 представляет собой нуклеиновую кислоту согласно варианту осуществления 7, где синтетический белок оболочки HIV состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 19.

Вариант осуществления 10 представляет собой вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 1-9, где нуклеиновая кислота функционально связана с последовательностью промотора.

Вариант осуществления 11 представляет собой вектор согласно варианту осуществления 10, представляющий собой вирусный вектор, предпочтительно аденовирусный вектор и более предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26.

Вариант осуществления 12 представляет собой выделенную клетку, содержащую вектор согласно варианту осуществления 10 или варианту осуществления 11.

Вариант осуществления 13 представляет собой композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество вектора согласно варианту осуществления 10 или п.11 и носитель.

Вариант осуществления 14 представляет собой вакцинную комбинацию, содержащую первую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество аденовирусного вектора, предпочтительно вектора на основе аденовируса серотипа 26, кодирующего синтетический белок оболочки HIV, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, вторую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество второго аденовирусного вектора, предпочтительно второго вектора на основе аденовируса серотипа 26, кодирующего антигенный полипептид HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и необязательно по меньшей мере одну дополнительную композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество по меньшей мере одного, выбранного из группы, состоящей из вектора, кодирующего антигенный полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4, 28 и 29, и выделенного антигенного полипептида HIV, имеющего остатки 30-708 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 или остатки 30-724 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 36, где первая композиция, вторая композиция и дополнительная композиция находятся в одной и той же композиции или в одной или нескольких разных композициях.

Вариант осуществления 15 представляет собой способ индукции иммунного ответа на вирус иммунодефицита человека (HIV) у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту композиции согласно варианту осуществления 13 или вакцинной комбинации согласно варианту осуществления 14.

Вариант осуществления 16 представляет собой композицию согласно варианту осуществления 13 или вакцинную комбинацию согласно варианту осуществления 14, содержащую аденовирусный вектор, предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26, кодирующий синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, второй аденовирусный вектор, предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26, кодирующий антигенный полипептид HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, один или несколько дополнительных аденовирусных векторов, кодирующих один или несколько дополнительных антигенных полипептидов, содержащих аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4, 28 и 29, и выделенный антигенный полипептид HIV, содержащий остатки 30-708 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 или остатки 30-724 SEQ ID NO: 36, для применения в индукции иммунного ответа на вирус иммунодефицита человека (HIV).

Вариант осуществления 17 представляет собой синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 8, имеющую одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из (i) I529P, (ii) K480E и (iii) комбинации EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C.

Вариант осуществления 18 представляет собой синтетический белок оболочки HIV согласно варианту осуществления 17, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 с комбинацией мутаций EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C, или остатки 30-704 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, или остатки 30-686 SEQ ID NO: 19.

Вариант осуществления 19 представляет собой композицию согласно варианту осуществления 13, дополнительно содержащую один или несколько дополнительных векторов экспрессии, кодирующих один или несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV, и/или один или несколько выделенных антигенных полипептидов HIV.

Вариант осуществления 20 представляет собой композицию согласно варианту осуществления 13, содержащую аденовирусный вектор, предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26, кодирующий синтетический белок оболочки HIV, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 21 представляет собой композицию согласно варианту осуществления 20, дополнительно содержащую второй аденовирусный вектор, предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26, кодирующий антигенный полипептид HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, и необязательно один или несколько дополнительных аденовирусных векторов, предпочтительно векторов на основе аденовируса серотипа 26, кодирующих один или несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV, содержащих аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1-4, 28 и 29.

Вариант осуществления 22 представляет собой способ получения иммунного ответа на вирус иммунодефицита человека (HIV) у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту композиции согласно любому из вариантов осуществления 19, 20 или 21.

Вариант осуществления 23 представляет собой способ получения композиции или вакцинной комбинации, включающий объединение вектора согласно варианту осуществления 10 или варианту осуществления 11 с носителем и необязательно одним или несколькими дополнительными векторами, кодирующими один или несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV, и/или одним или несколькими выделенными антигенными полипептидами HIV в одну или несколько композиций вместе с носителем.

Вариант осуществления 24 представляет собой вакцинную комбинацию для индукции иммунного ответа на вирус иммунодефицита человека (HIV) у субъекта, содержащую:

(i) первую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество вектора экспрессии, кодирующего синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 8, имеющую одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из (i) I529P, (ii) K480E и (iii) комбинации EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C, и носитель; и

(ii) вторую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида HIV и носитель,

где одна из первой и второй композиций предназначена для примиряющей иммунизации, а другая композиция предназначена для бустерной иммунизации, и

где вакцинная комбинация необязательно дополнительно содержит иммуногенно эффективное количество одного или нескольких дополнительных векторов экспрессии, кодирующих один или несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV, и при этом один или несколько дополнительных векторов экспрессии включены в первую или вторую композицию или одну или несколько дополнительных композиций, подлежащих применению вместе с первой или второй композицией.

Вариант осуществления 25 представляет собой вакцинную комбинацию согласно варианту осуществления 24, где первая композиция содержит аденовирусный вектор, предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26, кодирующий синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18; выделенный антигенный полипептид HIV содержит остатки 30-708 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 или остатки 30-724 SEQ ID NO: 36; и один или несколько дополнительных векторов экспрессии представляют собой аденовирусные векторы, предпочтительно векторы на основе аденовируса серотипа 26, кодирующие один или несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-5, 28 и 29.

Вариант осуществления 26 представляет собой способ индукции иммунного ответа на вирус иммунодефицита человека (HIV) у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает:

(i) введение субъекту первой композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество вектора экспрессии, кодирующего синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 8, имеющую одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из (i) I529P, (ii) K480E и (iii) комбинации EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C, и носитель;

(ii) введение субъекту второй композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида HIV и носитель; и

(iii) необязательно введение субъекту иммуногенно эффективного количества одного или нескольких дополнительных векторов экспрессии, кодирующих один или несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV,

где стадии (i) и (ii) выполняют в любом порядке, при этом одна из стадий предназначена для примирующей иммунизации, а другая стадия для бустерной иммунизации, и необязательное эффективное количество одного или нескольких дополнительных векторов экспрессии предпочтительно вводят вместе с первой композицией.

Вариант осуществления 27 представляет собой способ согласно варианту осуществления 26, где первая композиция содержит аденовирусный вектор, предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26, кодирующий синтетический белок оболочки HIV, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, и второй аденовирусный вектор, предпочтительно вектор на основе аденовируса серотипа 26, кодирующий антигенный полипептид HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; вторая композиция содержит выделенный антигенный полипептид HIV, содержащий остатки 30-708 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 или остатки 30-724 SEQ ID NO: 36; и необязательные один или несколько дополнительных векторов экспрессии представляют собой аденовирусные векторы, предпочтительно векторы на основе аденовируса серотипа 26, кодирующие один или несколько дополнительных антигенных полипептидов HIV, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28 и 29; где первую композицию вводят субъекту необязательно вместе с одним или несколькими дополнительными векторами экспрессии один или несколько раз в целях примирующей иммунизации, а вторую композицию вводят субъекту один или несколько раз в целях бустерной иммунизации.

Вариант осуществления 28 представляет собой синтетический белок оболочки HIV, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19 с сигнальной последовательностью или без нее.

Вариант осуществления 29 представляет собой вакцинную комбинацию, содержащую один или несколько векторов вместе, содержащих последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие (i) первый синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, и (ii) второй белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5.

Вариант осуществления 30 представляет собой вакцинную комбинацию согласно варианту осуществления 29, где первый синтетический белок оболочки HIV содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

Вариант осуществления 31 представляет собой вакцинную комбинацию, содержащую следующие компоненты:

(i) вектор на основе Ad26, кодирующий синтетический белок оболочки HIV, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 18; и

(ii) вектор на основе Ad26, кодирующий белок оболочки HIV, состоящий из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 5.

Вариант осуществления 32 представляет собой вакцинную комбинацию согласно варианту осуществления 31, дополнительно содержащую следующий компонент:

(iii) вектор на основе Ad26, кодирующий антигены HIV, состоящие из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 28.

Вариант осуществления 33 представляет собой вакцинную комбинацию согласно варианту осуществления 31 или 32, дополнительно содержащую следующий компонент:

(iv) вектор на основе Ad26, кодирующий антигены HIV, состоящие из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 29.

Вариант осуществления 34 представляет собой вакцинную комбинацию согласно любому из вариантов осуществления 31-33, дополнительно содержащую следующий компонент:

(v) выделенный антигенный полипептид HIV, содержащий остатки 30-708 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 или остатки 30-724 аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 36, необязательно дополнительно содержащую адъювант.

Вариант осуществления 35 представляет собой способ индукции иммунного ответа на вирус иммунодефицита человека (HIV) у субъекта-человека, нуждающегося в этом, при этом способ включает:

(a) введение субъекту (i) вектора на основе гAd26, кодирующего синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18; (ii) вектора на основе гAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; (iii) вектора на основе гAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28; и (iv) вектора на основе гAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29; где векторы на основе гAd26 предпочтительно вводят в соотношении, составляющем приблизительно 1:1:1:1, в общей дозе, составляющей приблизительно 1-10×10¹⁰ вирусных частиц (vp), например 5×10¹⁰ vp;

(b) повторение стадии (a) через приблизительно 10-14 недель, например через 12 недель, после стадии (a);

(c) введение субъекту (i) вектора на основе гAd26, кодирующего синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18; (ii) вектора на основе гAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; (iii) вектора на основе гAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28; (iv) вектора на основе гAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29; (v) выделенного белка gp140 HIV, имеющего последовательность из аминокислот 30-708 SEQ ID NO: 7; и (vi) адьюванта, представляющего собой фосфат алюминия; где векторы на основе гAd26 предпочтительно вводят в соотношении, составляющем приблизительно 1:1:1:1, в общей дозе, составляющей приблизительно 1-10×10¹⁰ вирусных частиц (vp), например 5×10¹⁰ vp, и где выделенный белок gp140 HIV вводят в дозе, составляющей приблизительно 50-300 мкг, например 250 мкг; через приблизительно 20-28 недель, например через 24 недели, после стадии (a); и

(d) повторение стадии (c) через приблизительно 42-54 недели, например через 48 недель, после стадии (a).

Вариант осуществления 36 представляет собой способ индукции иммунного ответа на вирус иммунодефицита человека (HIV) у субъекта-человека, нуждающегося в этом, при этом способ включает:

(a) введение субъекту (i) вектора на основе гAd26, кодирующего синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18; (ii) вектора на основе гAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; (iii) вектора на основе гAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28; и (iv) вектора на основе гAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29; где векторы на основе гAd26 предпочтительно вводят в соотношении, составляющем приблизительно 1:1:1:1, в общей дозе, составляющей приблизительно 1-10×10¹⁰ вирусных частиц (vp), например 5×10¹⁰ vp;

(b) повторение стадии (a) через приблизительно 10-14 недель, например через 12 недель, после стадии (a);

(c) введение субъекту (i) вектора на основе гAd26, кодирующего синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18; (ii) вектора на основе гAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5; (iii) вектора на основе гAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28; (iv) вектора на основе гAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29; (v) выделенного белка gp140 HIV, имеющего последовательность из аминокислот 30-708 SEQ ID NO: 7; (vi) выделенного белка gp140 HIV, имеющего последовательность из аминокислот 30-724 SEQ ID NO: 36; и (vi) адьюванта, представляющего собой фосфат алюминия; где векторы на основе гAd26 предпочтительно вводят в соотношении, составляющем приблизительно 1:1:1:1, в общей дозе, составляющей приблизительно 1-10×10¹⁰ вирусных частиц (vp), например 5×10¹⁰ vp, и где выделенные белки gp140 HIV вводят в соотношении, составляющем приблизительно 1:1, в общей дозе, составляющей приблизительно 50-300 мкг, например 250 мкг; через приблизительно 20-28 недель, например через 24 недели, после стадии (a); и

(d) повторение стадии (c) через приблизительно 42-54 недели, например через 48 недель, после стадии (a).

Примеры

Пример 1. Конструирование последовательностей антигенов оболочки HIV.

Конструировали несколько последовательностей антигенов оболочки HIV, обладающих сходством с последовательностью мозаичного антигена mos2Env HIV (SEQ ID NO: 6; ранее также описан в WO 2010/059732). В основе новоконструированных мембраносвязанных последовательностей лежали полностью природные последовательности дикого типа (их комбинация) из белков оболочки HIV или химерный продукт сочетания последовательности mos2Env и последовательностей белков оболочки HIV дикого типа. В дополнение к полноразмерным последовательностям белков оболочки (см. фиг. 1A) также конструировали последовательности, имеющие С-концевое усечение цитоплазматического домена (см., например, фиг. 1C). См. также, например, Schiernle et al., PNAS 1997; Abrahamyan et al., J. Virol. 2005; Edwards et al., J. Virology, 2002, 76:2683-2691. Растворимые варианты также получали путем С-концевого усечения перед трансмембранной (TM) областью, которую замещали тримеризационным доменом, таким как тримеризационный домен GCN4 (см., например, фиг. 1B). Эти растворимые варианты дополнительно превращали в одноцепочечный вариант посредством мутации участка расщепления фурином, ингибируя, таким образом, процессинг внеклеточного домена белка оболочки до субъединиц gp120 и gp41.

Из всех полученных и протестированных конструкций конструкции на основе С4 обладали наиболее оптимальными свойствами, например хорошими технологичностью, сворачиванием, иммуногенностью и т.д., и их отбирали для дополнительных исследований. В дополнительных исследованиях также получа-

ли и тестировали растворимый вариант конструкции С4, имеющий тримеризационный домен GCN4 вместо трансмембранного домена (sC4, фиг. 1B), и вариант, содержащий 7-аминокислотный фрагмент цитоплазматического домена из (C4D7, фиг. 1C). Аминокислотные последовательности С4, sC4 и C4D7 показаны под SEQ ID NO: 17, 19 и 18 соответственно. Последовательности, кодирующие их, показаны под SEQ ID NO: 25, 27 и 26 соответственно. Конструкция С1 имела последовательность внеклеточного домена на основе последовательности mos2Env (SEQ ID NO: 6). Также получали растворимый вариант конструкции С1, имеющий тримеризационный домен GCN4 вместо трансмембранного домена (sC1), и вариант, содержащий 7-аминокислотный фрагмент цитоплазматического домена (C1D7), аналогичный sC4 и C4D7, показанным на фиг. 1B и 1C соответственно. Конструкцию С1 и ее варианты применяли в дополнительных исследованиях в целях сравнения, поскольку в их основе, по существу, лежала последовательность mos2Env из предшествующего уровня техники. Аминокислотные последовательности С1, sC1 и C1D7 показаны под SEQ ID NO: 31, 30 и 32 соответственно. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие их, показаны под SEQ ID NO: 34, 33 и 35 соответственно. Другие протестированные конструкции были менее оптимальными, чем конструкции на основе конструкции С4, и их не отбирали для дальнейшей разработки.

Пример 2. Экспрессия и сворачивание синтетических белков оболочки HIV.

У синтетических белков оболочки HIV измеряли уровень экспрессии, сворачивание и экспрессию на поверхности клеток.

Уровни экспрессии.

Клетки HEK293F транзигентно трансфицировали плазмидой, кодирующей растворимые синтетические белки оболочки HIV sC1 и sC4, описанные в примере 1. Уровни экспрессии растворимого белка измеряли в надосадочной жидкости с помощью количественного вестерн-блоттинга (QWB). Результаты показаны на фиг. 2. Низкие уровни экспрессии sC1 (который, по существу, соответствует mos2Env с добавленным трансмембранным доменом) согласуются с недавними наблюдениями авторов настоящего изобретения в отношении mos2Env. Как показывают результаты, вариант sC4 по настоящему изобретению показывал значительно более высокие уровни экспрессии, чем вариант sC1 (контроль).

Сворачивание белка.

Сворачивание белка тестировали путем измерения связывания растворимых синтетических белков оболочки HIV с антителом (Mab 17b), о котором известно, что оно связывается с корцепторсвязывающим участком белка оболочки HIV, который становится доступным только после связывания с CD4, с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). В частности, связывание очищенного sC4 тестировали в отношении связывания с Mab 17b с предварительным связыванием sC4 с CD4 и без предварительного связывания sC4 с CD4. Очищенный sC1 применяли в качестве контроля. Связывание Mab 17b с sC4 без предварительного связывания CD4 с белком оболочки указывает на частично развернутый или предварительно активированный белок оболочки (т.е. нестабильный Env, который принимает "открытую" конформацию в отсутствие связывания с CD4). Результаты ELISA-анализа показаны на фиг. 3A и 3B.

Как показано на фиг. 3B, sC4 демонстрирует сильное связывание с Mab 17b при наличии предварительного связывания с CD4, но в то же время не демонстрирует выявляемое связывание с Mab 17b в отсутствие предварительного связывания с CD4. В отличие от этого, как показано на фиг. 3A, sC1 демонстрировал намного более низкое связывание с Mab 17b как при наличии предварительного связывания с CD4, так и в его отсутствие. Результаты позволяют предположить, что sC4 имеет правильный профиль сворачивания без перехода корцепторсвязывающего участка в состояние доступности до связывания с CD4.

Сворачивание белка также анализировали с помощью нативного электрофореза в полиакриламидном геле (PAGE) sC1 и sC4, чтобы оценить четвертичную структуру растворимых вариантов белка и возможное неправильное образование дисульфидных мостиков между протомерами. После электрофореза в нативном геле белок в геле выявляли с помощью вестерн-блот-анализа. Как показывают результаты на фиг. 4, большая часть sC4 находится в тримерном состоянии, которое представляет собой правильную четвертичную структуру.

В совокупности результаты экспериментов в отношении сворачивания белка демонстрируют, что растворимый синтетический белок оболочки HIV sC4 имеет требуемый профиль сворачивания, который является улучшенным по сравнению с профилем сворачивания существующего антигена mos2Env (представленного sC1).

Экспрессия на поверхности клеток.

Также исследовали экспрессию мембраносвязанных вариантов белков оболочки HIV С1 (полноразмерного), С4 (полноразмерного, см. фиг. 1A), С1D7 и С4D7 на поверхности клеток. Клетки HEK293T транзигентно трансфицировали только плазмидой, кодирующей eGFP (отрицательный контроль, NC), или плазмидой, кодирующей eGFP, вместе с экспрессионной конструкцией, кодирующей вариант белка оболочки HIV. Через два дня после трансфекции клетки подвергали анализу по методу сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) при воздействии нескольких поли- и моноклональных антител, направленных на gp120, и вторичных антител, а затем изучали уровни экспрессии белка оболочки на по-

верхности клеток. Качество вариантов белков оболочки оценивали путем определения общих уровней экспрессии с помощью поликлонального антитела к gp120 и путем оценки относительного связывания с нейтрализующими антителами широкого спектра действия PG9 и PG16, связывание с которыми зависит от четвертичной структуры и которые преимущественно связываются с правильно свернутым тримером белка оболочки.

Результаты экспериментов в отношении экспрессии на поверхности клеток показаны на фиг. 5. Уровни поверхностной экспрессии усеченных вариантов C1D7 и C4D7, измеренные с помощью антитела к gp120, намного превышают уровни поверхностной экспрессии их полноразмерных эквивалентов, C1 и C4 соответственно. Это подтверждает, что при делеции 144 остатков с карбоксильного конца Env увеличиваются уровни поверхностной экспрессии белка оболочки. Полноразмерная конструкция C4 по настоящему изобретению также демонстрировала улучшенное связывание с PG9 и PG16 по сравнению с полноразмерным C1, что позволяет предположить, что последовательность белка оболочки C4 свернута надлежащим образом (т.е. в виде тримера) на поверхности клеток.

Результаты также показывают, что вариант C1D7, который, по существу, представляет собой Mos2Env с добавленным трансмембранным доменом и 7 аминокислотами цитоплазматического домена, может экспрессироваться на поверхности клеток HEK293T. Этим он отличается от растворимой конструкции Ad26.mos2Env, которая при введении в клетки A549 путем трансфекции не может экспрессироваться на поверхности на выявляемых уровнях. Однако относительное связывание с PG9 и PG16 с трудом можно выявить на уровне выше фонового, что позволяет предположить, что последовательность белка оболочки C1D7 свернута ненадлежащим образом и, вероятно, находится не в форме инактного тримера на поверхности клеток.

В целом, вариант C4D7 белка оболочки обладает наиболее оптимальным профилем связывания с антителами, характеризуясь более высоким уровнем экспрессии gp120, чем у его полноразмерного эквивалента C4, и более чем в 15 раз увеличенным связыванием с PG9 и PG16 по сравнению с C1 и C1D7 (фиг. 5).

Пример 3. Стабильность векторов, кодирующих последовательности белков оболочки HIV.

Проведенная ранее исследовательская работа в лабораториях авторов настоящего изобретения (неопубликованная) указывала на то, что векторы на основе аденовируса серотипа 26 (Ad26), кодирующие последовательность антигена mos2Env, как было показано, характеризовались относительно высокими соотношениями VP/IU (что указывает на более низкое качество партий продукта аденовируса), и, кроме того, что у таких векторов проявлялись проблемы со стабильностью. Соответственно, было важно протестировать стабильность конструкций синтетических белков оболочки HIV по настоящему изобретению в аденовирусном окружении.

Векторы на основе рекомбинантного Ad26 (rAd26), кодирующие последовательности антигенов HIV C4, C4D7 и sC4 по настоящему изобретению, описанные выше в примере 1, получали в клетках PER.C6 (они называются соответственно "rAd26.C4", "rAd26.C4D7" и "rAd26.sC4"). Клоны векторов (бляшки) отбирали и разрачивали для получения исследуемых партий. Не более 5 клонов вируса (бляшек) разрачивали до формата T25 и подвергали серийному пассажу в течение 10 пассажей в формате T25 (при этом пассажи 1-3 представляли собой стадии трансфекции и очистки методом бляшкообразования, и за ними следовали 10 пассажей в формате T25, в результате чего общее число пассажей составляло 13). Генетическую стабильность оценивали на 3, 5, 10 и 13 пассаже вируса (vrp) с помощью ПЦР-анализа кассеты экспрессии трансгена в E1 с последующим секвенированием на 13 vrp. Результаты показаны на фиг. 6.

Векторы на основе rAd26, кодирующие полноразмерный C4 (rAd26.C4), демонстрировали неудовлетворительные характеристики роста, которые определяли по отсутствию полного цитопатогенного эффекта (CPE) через 2-3 дня; генетическую нестабильность, которую определяли по делециям в области E1 с кассетой экспрессии трансгена; или их комбинацию (фиг. 6). Из-за неудовлетворительных характеристик роста и наблюдаемой генетической нестабильности этот вектор, кодирующий полноразмерный C4, в дальнейшем не рассматривали.

В отличие от этого в случае векторов на основе rAd26, кодирующих C4D7 (rAd26.C4D7) и sC4 (rAd26.sC4), весь размноженный материал из бляшек оставался генетически стабильным на протяжении эксперимента (фиг. 6). Таким образом, новые конструкции sC4 и C4D7 превосходят исходную конструкцию mos2Env в отношении стабильности в окружении аденовирусного вектора. Тестирование генетической стабильности вплоть до vrp 13 представлено размножением, на несколько пассажей более длительным, чем при применении в получении векторов в промышленном масштабе.

Пример 4. Экспрессия и антигенность *in vivo* последовательностей белков оболочки HIV в аденовирусных векторах.

Экспрессию и антигенность rAd26.C4D7 и rAd26.sC4 оценивали по отдельности или в комбинации с вектором на основе рекомбинантного Ad26, кодирующим mos1Env (SEQ ID NO: 5) (далее в данном документе "rAd26.mos1Env"), в трансдуцированных вектором клетках A549 (линия клеток человека) *in vitro* (данные не показаны). Анализ по методу проточной цитометрии показал, что все антигены экспрессировались в культурах клеток, трансдуцированных 2×10^4 вирусных частиц (vrp) с одним антигеном обо-

лочки в качестве контролей либо 1×10^4 μ p с комбинацией из 2 антигенов Env путем аденовирусной трансдукции. Все материалы для трансдукции содержали однократные дозы (1×10^4 μ p) аденовирусных векторов, кодирующих mos1GagPol ("rAd26.mos1GagPol") и mos2GagPol ("rAd26.mos2GagPol") (Barouch et al., Nat. Med. 2010, 16:319-323), так что оцениваемые комбинации векторов демонстрировали такие же относительные количества различных аденовирусных векторов, какие предполагались для доклинического и клинического применения. Для клинического применения векторы, кодирующие синтетические белки оболочки HIV по настоящему изобретению, предпочтительно комбинируют с векторами, кодирующими антигены mos1GagPol и mos2GagPol.

Комбинация rAd26.mos1Env и rAd26.C4D7 давала максимальный охват оцениваемых эпитопов, что определяли путем связывания с моноклональными антителами. В частности, доступность эпитопа для PG16, которая обеспечивалась трансформацией с помощью Ad26.C4D7, является перспективной для применения в вакцинах, поскольку PG16 представляет собой нейтрализующее моноклональное антитело широкого спектра действия, которое распознает петлевую область V1/V2 Env HIV-1 (Walker et al., Science. 2009). Следовательно, синтетический белок оболочки HIV по настоящему изобретению, полученный из последовательности С4, увеличивает спектр иммунного ответа на белок оболочки HIV по сравнению с иммунным ответом, формируемым только mos1Env. Было показано, что индуцируемые вакциной иммунные ответы с образованием антител, направленные на данную область белка оболочки, коррелируют с защитой от инфекции, вызываемой HIV-1, в исследовании RV144 (Haynes et al., N. Engl. J. Med. 2012), и поэтому синтетический белок оболочки HIV по настоящему изобретению является перспективным кандидатом для включения в схемы вакцинации от HIV.

Пример 5. Иммуногенность векторов, кодирующих синтетические белки оболочки HIV.

Последовательности синтетических белков оболочки HIV по настоящему изобретению в окружении вектора на основе Ad26 тестировали на кроликах для определения того, являются ли эти конструкции иммуногенной альтернативой конструкции rAd26.mos2Env.

Иммуногенность аденовирусного вектора, кодирующего mos1Env (rAd26.mos1Env; SEQ ID NO: 5), тестировали в отдельности и в комбинации с аденовирусными векторами, кодирующими синтетические белки оболочки HIV по настоящему изобретению (rAd26.C4D7 и rAd26.sC4; содержащие SEQ ID NO: 8, в частности SEQ ID NO: 18 и 19 соответственно). Во всех случаях также вводили векторы на основе аденовируса серотипа 26, кодирующие антигены mos1GagPol и mos2GagPol (rAd26.mos1GagPol [SEQ ID NO: 28] и rAd26.mos2GagPol [SEQ ID NO: 29] соответственно). Более конкретно, иммуногенность rAd26.mos1Env в отдельности (трехвалентная вакцина: rAd26.mos1GagPol, rAd26.mos2GagPol и rAd26.mos1Env) сравнивали с иммуногенностью rAd26.mos1Env в комбинации с одним из rAd26.C4D7 или rAd26.sC4 (четырёхвалентная вакцина: введение rAd26.mos1GagPol, rAd26.mos2GagPol, rAd26.mos1Env и rAd26.C4D7 либо введение rAd26.mos1GagPol, rAd26.mos2GagPol, rAd26.mos1Env и rAd26.sC4). Данное сравнение трехвалентной вакцины, которая не содержит каких-либо векторов, кодирующих синтетические белки оболочки HIV по настоящему изобретению, с четырехвалентной вакциной, которая содержит векторы, кодирующие синтетические белки оболочки HIV по настоящему изобретению, позволяет определить то, вносят ли белки оболочки HIV по настоящему изобретению вклад в спектр защиты.

Введение проводили согласно схемам вакцинации, в которых данные векторы на основе Ad26 вводили в недели 0 и 6 в качестве двукратной праймирующей иммунизации, а белок gp140 из клады С (трехвалентный белок gp140 Env, имеющий SEQ ID NO: 7 без сигнальной пептидной последовательности из остатков 1-29, см. также WO 2010/042942) в недели 12 и 18 в качестве двукратной бустерной иммунизации (см., например, Barouch et al., 2015, Science 349: 320-324). В таблице описаны схемы вакцинации, применяемые в данном исследовании. Пустой rAd26 относится к контрольному вектору, не содержащему какой-либо ген, кодирующий последовательность антигенного белка HIV. Каждая группа включала шесть кроликов.

Схемы вакцинации, тестируемые в исследовании иммуногенности у кроликов

Группа	Первая и вторая иммунизации			Третья и четвертая иммунизации			N=
	Аденовирусные векторы	Доза (vp)	Общая доза (vp)	Бустерный белок	Доза (мкг)	Адъювант	
1	rAd26.Mos1Env	2,5×10 ¹⁰	5×10 ¹⁰	GP140 (клада С)	10	250 мкг AdjuPhos	6
	rAd26.Mos1GagPol	1,25×10 ¹⁰					
	rAd26.Mos2Gagpol	1,25×10 ¹⁰					
2	rAd26.Mos1Env	1,25×10 ¹⁰	5×10 ¹⁰	GP140 (клада С)	10	250 мкг AdjuPhos	6
	rAd26.C4D7	1,25×10 ¹⁰					
	rAd26.Mos1GagPol	1,25×10 ¹⁰					
	rAd26.Mos2Gagpol	1,25×10 ¹⁰					
3	rAd26.Mos1Env	1,25×10 ¹⁰	5×10 ¹⁰	GP140 (клада С)	10	250 мкг AdjuPhos	6
	rAd26.sC4	1,25×10 ¹⁰					
	rAd26.Mos1GagPol	1,25×10 ¹⁰					
	rAd26.Mos2Gagpol	1,25×10 ¹⁰					
Контрольная	Пустой rAd26	5×10 ¹⁰	5×10 ¹⁰	Нет данных	0	250 мкг AdjuPhos	6

Сравнение трехвалентной вакцины на основе Ad26 (не содержащей новых антигенов Env по настоящему изобретению) с четырехвалентной вакциной на основе Ad26 (которая содержит новые антигены sC4 или C4D7 Env) позволяет тестировать то, вносят ли новые антигены вклад в спектр защиты. Хорошо известный анализ нейтрализации с использованием клеток TZM-b1 [Montefiori D.C. Methods Mol. Biol. 2009, 485:395-405; Sarzotti-Kelsoe M. et al., J. Immunol. Methods 2014, 409:131-146] применяли для измерения нейтрализующей активности вакцин-кандидатов.

Результаты показаны на фиг. 7, и их статистический анализ осуществляли путем использования трехвалентной вакцины (группа 1 в таблице) в качестве контрольной группы и сравнения с ней каждой из новых четырехвалентных вакцин (группы 2 и 3 в таблице).

В целом, новые аденовирусные конструкции, полученные из C4 (т.е. кодирующие белки Env, содержащие SEQ ID NO: 8, которые являются альтернативой mos2Env), были иммуногенными после осуществления двух внутримышечных гомологичных иммунизации у кроликов.

Нейтрализующая способность у кроличьей антисыворотки к псевдовирусам категории 1B отсутствовала (данные не показаны), что не было неожиданным, так как известно, что такие вирусы более трудно нейтрализовать.

На способность кроличьей антисыворотки к вирусу категории 1A клды В к нейтрализации псевдовирусов не влияло добавление новых компонентов (данные не показаны). Это демонстрирует то, что новый антиген не оказывал отрицательное влияние на иммуногенность существующего антигена клды В, присутствующего в вакцине (несмотря на то, что новые компоненты были направлены на вирусы клды С, такое неблагоприятное влияние нельзя было исключить заведомо до проведения их тестирования).

Способность кроличьей антисыворотки к вирусу категории 1А клды С к нейтрализации псевдовирусов была значительно повышена в случае иммунизации новой четырехвалентной аденовирусной вакциной, содержащей C4D7 (четырёхвалентная, группа 2), по сравнению с трехвалентной вакциной (имеющей только mos1Env) в отдельности (группа 1) (фиг. 7, панель В). Кроме того, способность кроличьей

антисыворотки к вирусу категории 1А клды С к нейтрализации псевдовирусов в неделю 8 была значительно повышена в случае иммунизации новой четырехвалентной аденовирусной вакциной, содержащей sC4 (четырёхвалентная, группа 3), по сравнению с трехвалентной вакциной (имеющей только mos1Env) в отдельности (группа 1) (фиг. 7, панель В).

В заключение, необходимо отметить, что конструкции C4D7 и sC4, кодируемые Ad26, были иммуногенными, и их добавление расширяло связывающую и нейтрализующую способность вакцины, которая имела mos1Env (главным образом, клды В) в качестве единственного кодируемого Ad26 компонента Env, в отношении штаммов клды С (фиг. 7В).

Пример 6. Иммуногенность схем вакцинации, включающих введение векторов, кодирующих синтетические белки оболочки HIV по настоящему изобретению.

В одном дополнительном исследовании на кроликах оценивали четырехвалентную комбинацию векторов Ad26.Mos4.HIV (состоящую из четырех аденовирусных векторов: Ad26.Mos1GagPol [кодирующего SEQ ID NO: 28], Ad26.Mos2GagPol [кодирующего SEQ ID NO: 29], Ad26.Mos1Env [кодирующего SEQ ID NO: 5] и Ad26.Mos2SEnv [название "C4D7", используемое выше, также относится к "Mos2S"; этот вектор кодирует новую SEQ ID NO: 18 согласно настоящему изобретению] в смеси 1:1:1:1 в общей дозе, составляющей 5×10^9 vp), которую применяли внутримышечно в качестве двукратных примиряющих иммунизации в недели 0 и 6 в комбинации с рекомбинантными бустерными белками Env HIV-1 при применении gp140 из клды С [имеющего последовательность из аминокислотных остатков 30-708 SEQ ID NO: 7], мозаичного gp140 [имеющего последовательность из аминокислотных остатков 30-724 SEQ ID NO: 36] или комбинации gp140 из клды С и мозаичного gp140 в недели 13 и 19. Эти бустерные белки применяли внутримышечно в общей дозе, составляющей 10 или 50 мкг белка, в комбинации с 250 мкг адьюванта, представляющего собой фосфат алюминия, составленного в день иммунизации.

Результаты указывают на то, что все тестируемые схемы были иммуногенными у всех животных, индуцируя высокие титры антител и умеренную нейтрализующую активность в отношении Env-псевдотипированных вирусов категории 1. При применении мозаичного gp140 в качестве вакцинного антигена в отдельности либо в комбинации с gp140 из клды С титры антител, специфичных к мозаичному gp140, в ELISA и распознавание псевдовирусов клды В были значительно увеличенными на неделе 15 по сравнению с эталонной группой, получавшей бустерную иммунизацию gp140 из клды С в отдельности. Общая величина эффекта улучшения была умеренной и при этом большей для группы, получавшей бустерную иммунизацию бивалентной комбинацией gp140 из клды С - мозаичный gp140 по сравнению с мозаичным gp140 в отдельности. В неделю 21 исследования эти различия утрачивались, и иммунные ответы, измеренные для когорт, получавших бустерные дозы бивалентной комбинации gp140 из клды С - мозаичный gp140 или бустерные дозы моновалентного gp140 из клды С, были статистически неразличимыми.

Схема с применением бивалентного белка демонстрировала индукцию титров антител к вирусам клды С в ELISA и распознавание псевдовирусов, сравнимые с таковыми для схемы бустерной иммунизации gp140 из клды С в отдельности, что указывает на то, что включение мозаичного иммуногена gp140, относящегося к клде В, не оказывало отрицательного эффекта на охват антигенов из клды С и в то же время значительно повышало охват антигенов из клды В в неделю 15 исследования.

Данные подтверждают, что вектор Ad26.Mos2SEnv, кодирующий синтетический антиген Env согласно настоящему изобретению, можно успешно применять в схемах вакцинации.

Литературные источники

1. Barouch et al, Nat Med 2010, 16: 319-323.
2. WO 2010/059732.
3. Schiernle et al., PNAS 94: 8640-8645, 1997.
4. Abrahamyan et al., J Virol 79: 106-115, 2005.
5. US20120076812.
6. Barouch et al., Cell 155:1-9, 2013.
7. Havgana, et al., 2006, J Gen Virol 87: 2135-43.
8. WO 03/104467.
9. WO 2004/001032.
10. WO 2007/104792.
11. Abbink et al., (2007) Virol 81(9): 4654-63.
12. Патент США № 7270811.
13. Vogels et al., (2003) J Virol 77(15): 8263-71.
14. WO 00/70071.
15. WO2012/082918.
16. Walker LM, Phogat SK, Chan-Hui PY, Wagner D, Phung P, Goss JL, et al. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. Science 2009,326:285-289.
17. Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, Alam SM, et al. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. N Engl J Med 2012,366:1275-1286.
18. Barouch et al. (2015) Science 349: 320-324.
19. Montefiori DC. Measuring HIV neutralization in a luciferase reporter gene assay. Methods Mol Biol 2009,485:395-405.
20. Sarzotti-Kelsoe M, Bailer RT, Turk E, Lin CL, Bilska M, Greene KM, et al. Optimization and validation of the TZM-bl assay for standardized assessments of neutralizing antibodies against HIV-1. J Immunol Methods 2014,409:131-146.
21. Edwards et al., J. Virology, 2002, 76:2683-2691.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нуклеиновая кислота, кодирующая синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 8, имеющую одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из (i) I529P, (ii) K480E и (iii) комбинации EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C.

2. Нуклеиновая кислота по п.1, где синтетический белок оболочки HIV дополнительно содержит сигнальную последовательность, например сигнальную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9 - SEQ ID NO: 12.

3. Нуклеиновая кислота по п.1 или 2, где синтетический белок оболочки HIV дополнительно содержит трансмембранный домен, например трансмембранный домен, содержащий SEQ ID NO: 13.

4. Нуклеиновая кислота по п.3, где синтетический белок оболочки HIV дополнительно содержит SEQ ID NO: 37, слитую с С-концом SEQ ID NO: 8 и N-концом трансмембранного домена.

5. Нуклеиновая кислота по п.3, где синтетический белок оболочки HIV дополнительно содержит фрагмент цитоплазматического домена.

6. Нуклеиновая кислота по п.5, где фрагмент цитоплазматического домена содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 или ее остатки 1-4.

7. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-6, где синтетический белок оболочки HIV содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

8. Нуклеиновая кислота по п.1 или 2, где синтетический белок оболочки HIV дополнительно содержит тримеризационный домен.

9. Нуклеиновая кислота по п.8, где тримеризационный домен имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16.

10. Нуклеиновая кислота по п.1 или 2, где синтетический белок оболочки HIV содержит SEQ ID NO: 8, имеющую комбинацию мутаций EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C.

11. Нуклеиновая кислота по любому из пп.8 или 9, где синтетический белок оболочки HIV содержит аминокислотную последовательность из остатков 1-686 SEQ ID NO: 19.

12. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.1-11, где нуклеиновая кислота функционально связана с последовательностью промотора.

13. Вектор экспрессии по п.12, представляющий собой вирусный вектор, предпочтительно аденовирусный вектор.

14. Вектор экспрессии по п.13, где аденовирусный вектор представляет собой вектор на основе аденовируса человека серотипа 26 (Ad26).

15. Выделенная клетка для размножения вектора экспрессии по любому из пп.12-14, содержащая вектор экспрессии по любому из пп.12-14.

16. Композиция для индукции иммунного ответа на вирус иммунодефицита человека (HIV) у пациента, содержащая иммуногенно эффективное количество вектора экспрессии по любому из пп.12-14 и носитель.

17. Вакцинная комбинация для индукции иммунного ответа на вирус иммунодефицита человека (HIV) у пациента, содержащая:

(i) первую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество первого аденовирусного вектора, кодирующего синтетический белок оболочки HIV, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;

(ii) вторую композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество второго аденовирусного вектора, кодирующего антигенный полипептид HIV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

18. Вакцинная комбинация по п.17, в которой первый аденовирусный вектор представляет собой вектор на основе аденовируса серотипа 26, и второй аденовирусный вектор представляет собой вектор на основе аденовируса серотипа 26.

19. Вакцинная комбинация по п.17 или 18, в которой синтетический белок оболочки HIV имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

20. Вакцинная комбинация по любому из пп.17-19, дополнительно включающая:

(iii) по меньшей мере одну дополнительную композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество по меньшей мере одного, выбранного из группы, состоящей из

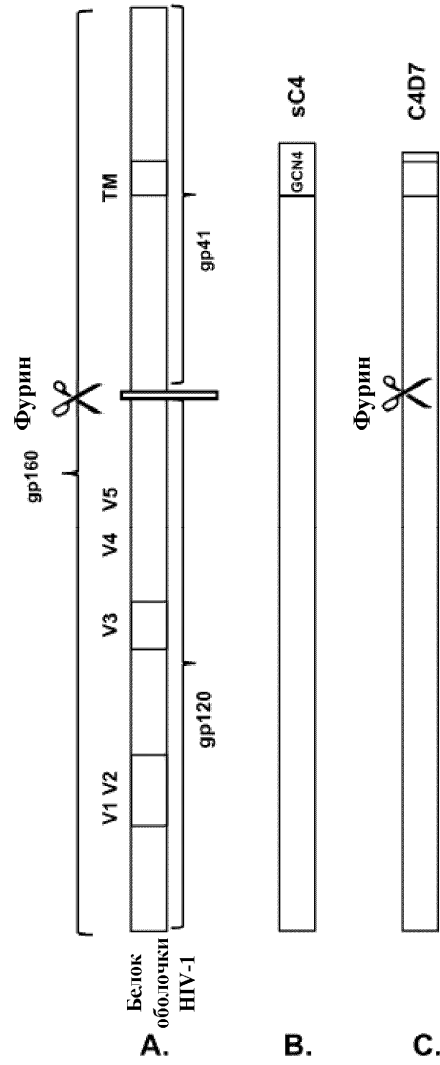
(iiia) вектора, кодирующего по меньшей мере один антигенный полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4, 28 и 29, и

(iiib) полипептида, содержащего иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида HIV, содержащего остатки 30-708 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 или остатки 30-724 SEQ ID NO: 36, где первая композиция, вторая композиция и дополнительная композиция находятся в одной и той же композиции или в одной или нескольких разных композициях.

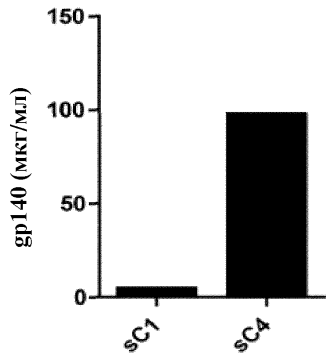
21. Способ индукции иммунного ответа на вирус иммунодефицита человека (HIV) у пациента, включающий введение пациенту композиции по п.16 или вакцинной комбинации по любому из пп.17-20.

22. Синтетический белок оболочки HIV, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 8, имеющую одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из (i) I529P, (ii) K480E и (iii) комбинации EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C.

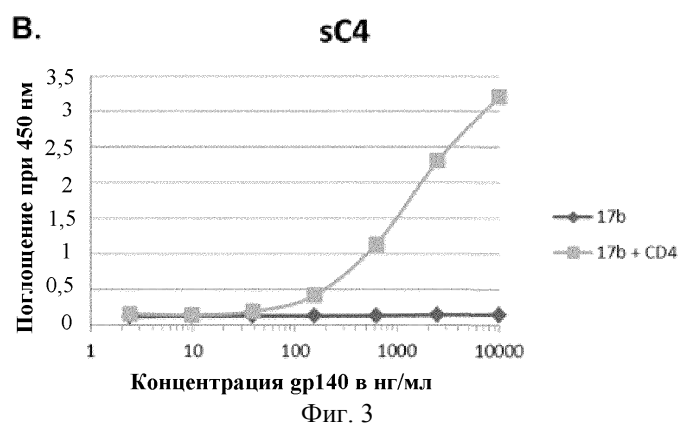
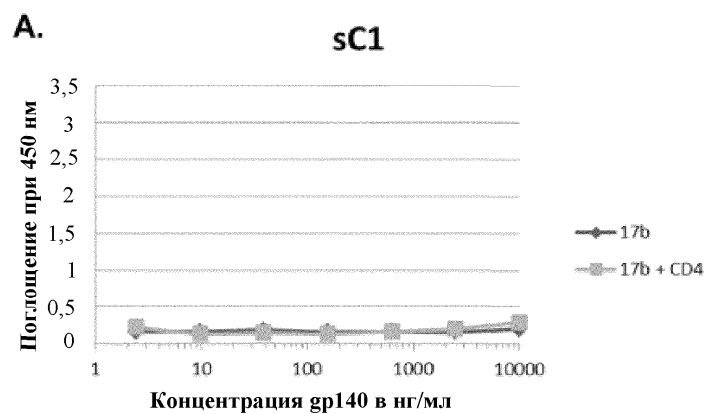
23. Синтетический белок оболочки HIV по п.22, содержащий (i) SEQ ID NO: 8, имеющую комбинацию мутаций EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C; (ii) аминокислотные остатки 30-704 SEQ ID NO: 18 или (iii) аминокислотные остатки 30-686 SEQ ID NO: 19.



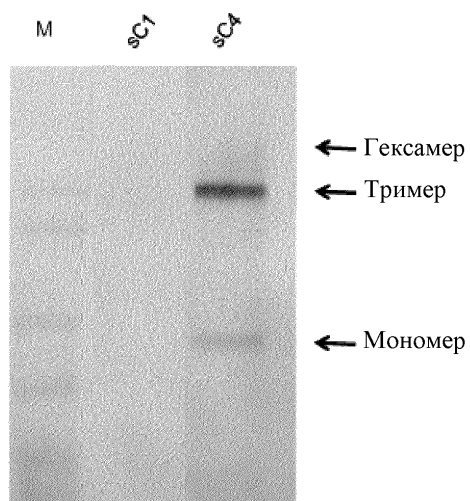
Фиг. 1



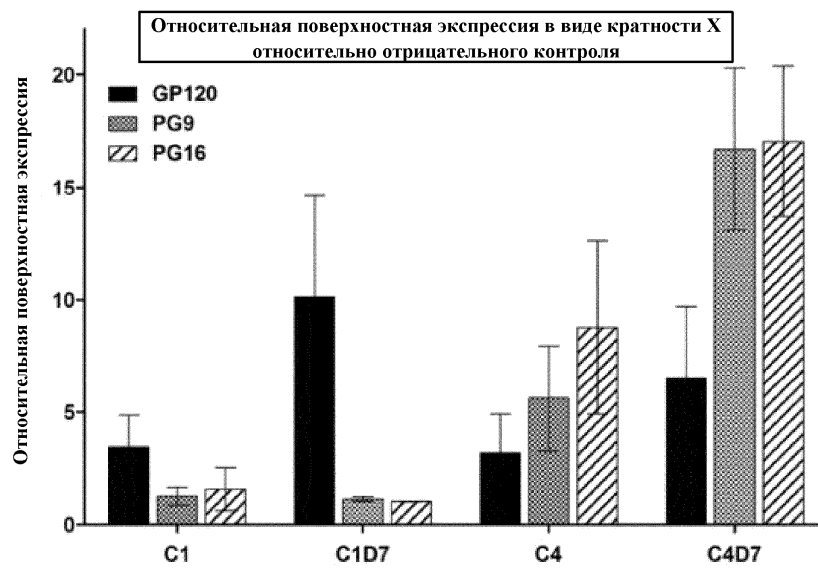
Фиг. 2



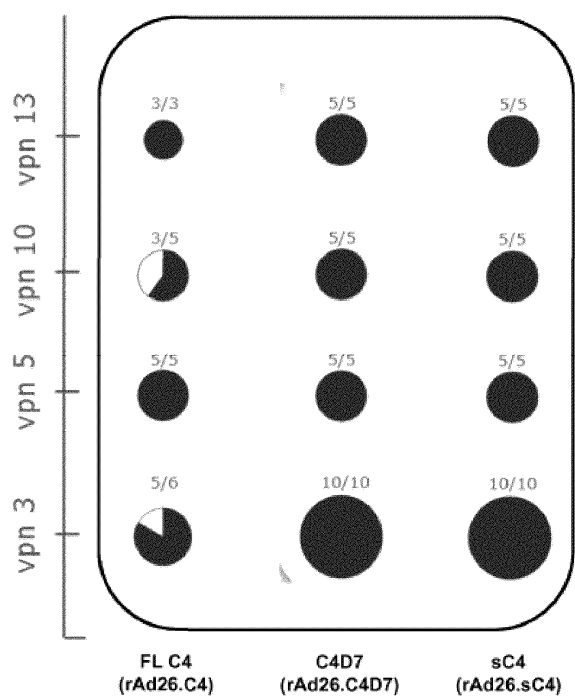
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

