

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290350** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.06.14

(22) Дата подачи заявки
2020.07.24

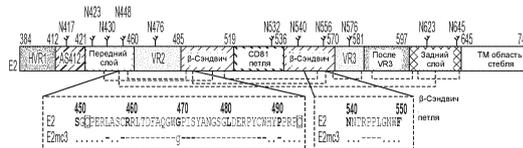
(51) Int. Cl. **A61P 1/16** (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) **СКОНСТРУИРОВАННЫЕ ИММУНОГЕНЫ Е2 НСV И РОДСТВЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ ВАКЦИНЫ**

(31) **62/879,100**
(32) **2019.07.26**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/043412**
(87) **WO 2021/021603 2021.02.04**
(88) **2021.04.22**
(71) Заявитель:
**ЗЕ СКРИППС РИСЁРЧ
ИНСТИТЮТ (US)**

(72) Изобретатель:
**Хэ Линьлин, Чжу Цзян, Зянг Эрик,
Лоу Мансун, Уилсон Иэн (US), Царум
Нетанель (IL)**
(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложены новые сконструированные иммуногены на основе полипептида Е2 вируса гепатита С (НСV) и соответствующие композиции вакцины, которые экспонируют сконструированные полипептиды Е2. В настоящем изобретении также предложены способы применения таких иммуногенов и композиций вакцины для различного терапевтического применения, например для предотвращения или лечения инфекций НСV.



202290350
A1

202290350
A1

СКОНСТРУИРОВАННЫЕ ИММУНОГЕНЫ E2 HCV И РОДСТВЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ ВАКЦИНЫ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 [0001] Настоящая заявка на патент испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США номер 62/879,100 (поданной 26 июля 2019 г., находящейся в настоящий момент на рассмотрении). Полное описание приоритетной заявки полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки и для всех целей.

10 ЗАЯВЛЕНИЕ О ПОДДЕРЖКЕ ПРАВИТЕЛЬСТВА

[0002] Настоящее изобретение было осуществлено при поддержке правительства согласно грантам AI129698, AI125078, AI123861, AI079031 и AI106005, выданным Национальными институтами здоровья. Правительство обладает определенными правами на настоящее изобретение.

15

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Вирус гепатита С (HCV) инфицирует 1-2% населения в мире и создает существенную нагрузку на систему здравоохранения, что приводит к ~500 000 смертей ежегодно и по оценкам к 1,5-2 миллионам новых случаев инфицирования 20 каждый год. Эпидемия употребления опиоидов, приведшая к более чем 70000 смертей, связанных с передозировкой, только в 2017 году, непосредственно способствует быстрому росту инфекции HCV в Северной Америке. У большинства пациентов с HCV (75–85%) развивается хроническая инфекция, приводящая к гепатоцеллюлярной карциноме, циррозу и другим тяжелым 25 заболеваниям печени. Хотя ожидается, что противовирусная терапия прямого действия (DAA) увеличит частоту излечения HCV, проблемы остаются, потому что диагноз обычно обнаруживают на поздней стадии после повреждения печени. Лечение DAA не может предотвратить повторное инфицирование HCV или снизить риск рака печени при распространенном заболевании печени, и может 30 возникнуть резистентность. Действительно, повышенная смертность, связанная с HCV, и новые случаи инфицирования среди лиц, употребляющих наркотики

путем инъекций (IDU), подчеркивают острую необходимость разработки эффективной профилактической вакцины для борьбы с HCV.

5 [0004] Основная проблема в разработке вакцины против HCV заключается в том, как вызвать широкий защитный иммунный ответ для преодоления высокого генетического разнообразия семи основных генотипов HCV и более 86 подтипов. Кроме того, быстрые мутации приводят к появлению вирусных квазивидов у инфицированных индивидуумов, что приводит к ускользанию от иммунитета. Несмотря на это, спонтанный клиренс вируса у 20-30% инфицированных пациентов в острой фазе предполагает, что хроническую инфекцию, вызванную вирусом гепатита С, можно предотвращать, если эффективный иммунный ответ может быть вызван вакцинацией.

10 [0005] Несмотря на существенный прогресс в дизайне вакцин, все еще существует необходимость в области медицины в более эффективных и активных иммуногенах вакцины, например, для предотвращения инфекций, вызванных невирусными или вирусными патогенами (например, инфекции, вызванной HCV). Настоящее изобретение удовлетворяет потребности в данной области техники.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

20 [0006] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложены модифицированные полипептиды эктодомена E2 HCV. Указанные полипептиды содержат сконструированную последовательность эктодомена E2, у которой изменен дизайн (т.е., она дополнительно модифицирована) посредством по меньшей мере одного из следующего: (а) усечение в области VR2 с нарушением порядка и (b) делеция в β -сэндвич-петле, соединяющей β -листы 6 и 7 β -сэндвич-домена. Согласно некоторым вариантам реализации сконструированная последовательность эктодомена E2 перед дополнительной модификацией содержит последовательность SEQ ID NO:4, ее вариант с консервативными модификациями или по существу идентичную ей последовательность. В

25 некоторых из указанных модифицированных полипептидов эктодомена E2 HCV, усечение области VR2 с нарушением порядка включает замену остатков 41-61 последовательности SEQ ID NO:4, CPERLASC GSSGCWHYPPRPC (SEQ ID NO:6), на CPERASGHYPPRPC (SEQ ID NO:10). В некоторых модифицированных

полипептидах эктодомена E2 HCV усечение области VR2 с нарушением порядка включает замену остатков 41-61 последовательности SEQ ID NO:4, CPERLASCSSGCGWHYPPRPC (SEQ ID NO:6) последовательностью согласно CXXXXXXHYPPRPC (SEQ ID NO:8) или CXXXXXXHYPPRPC (SEQ ID NO:9), где X представляет собой любой аминокислотный остаток. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации XXXXXX (SEQ ID NO:75) в SEQ ID NO:8 представляет собой QNWDEP (SEQ ID NO:11), KVNIDP (SEQ ID NO:12), EKVEEL (SEQ ID NO:13), PDENMK (SEQ ID NO:14) или KREEKM (SEQ ID NO:15). Согласно некоторым другим вариантам реализации XXXXX (SEQ ID NO:76) в SEQ ID NO:9 представляет собой PKTEV (SEQ ID NO:16), KRVDI (SEQ ID NO:17), PSDMV (SEQ ID NO:18), PNEEE (SEQ ID NO:19) или KKEIR (SEQ ID NO:20).

[0007] В некоторых модифицированных полипептидах эктодомена E2 HCV согласно настоящему изобретению делеция последовательности β -сэндвич петли (SEQ ID NO:21) из сконструированной последовательности эктодомена E2 SEQ ID NO:4 включает делецию одного или более остатков, которые образуют кончик β -сэндвич петли. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации остатки, которые образуют кончик β -сэндвич петли, представляют собой остатки 543-546 из SEQ ID NO:4. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации остатки 543-546 из SEQ ID NO:4, RRPL (SEQ ID NO:22), удалены (делетированы).

[0008] Некоторые модифицированные полипептиды эктодомена E2 HCV согласно настоящему изобретению содержат как усечение в области VR2 с нарушением порядка, так и делецию в β -сэндвич петле. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации указанный модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV содержит аминокислотную последовательность согласно любой из последовательностей SEQ ID NO:26-38, ее вариант с консервативными модификациями или по существу идентичную ей последовательность.

[0009] Согласно некоторым связанным аспектам, в настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, которые кодируют модифицированные полипептиды эктодомена E2 HCV, описанные в настоящей заявке (полипептиды, представленные в SEQ ID NO:26-38), векторы или экспрессионные конструкции, которые содержат такую последовательность полинуклеотидов, а также

фармацевтические композиции, которые содержат модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV согласно настоящему изобретению.

[0010] Согласно другому аспекту, в настоящем изобретении предложены композиции вакцины, которые содержат полипептид модифицированного эктодомена E2 HCV, описанный в настоящей заявке, который экспонируется на поверхности самособирающейся наночастицы. Согласно некоторым вариантам реализации С-конец модифицированного полипептида эктодомена E2 HCV слит с N-концом субъединицы самособирающейся наночастицы посредством линкерной последовательности. В некоторых из этих вакцин на основе наночастиц линкерная последовательность, соединяющая модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV с субъединицей наночастицы, содержит (GGGGS)₂ (SEQ ID NO:42). Согласно некоторым из указанных вариантов реализации указанный модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV, экспонируемый на наночастице, содержит аминокислотную последовательность согласно любой из последовательностей SEQ ID NO:26-38, ее вариант с консервативными модификациями или по существу идентичную ей последовательность. Согласно любому из указанных вариантов реализации изобретения, используемая самособирающаяся наночастица может иметь последовательность субъединиц согласно SEQ ID NO:39 (E2p), SEQ ID NO:40 (I3-01), SEQ ID NO:41 (ферритин), ее вариант с консервативными модификациями или по существу идентичную ей последовательность.

[0011] Согласно другому связанному аспекту, в настоящем изобретении предложены полинуклеотидные последовательности, которые кодируют слитый белок, содержащий модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV, описанный в настоящей заявке, и субъединицу самособирающуюся наночастицы. В кодируемом слитом белке, как правило, модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV слит на своем С-конце с N-концом субъединицы самособирающейся наночастицы. Другой связанный аспект настоящего изобретения относится к векторам или экспрессионным конструкциям, несущим такую полинуклеотидную последовательность. Согласно другому аспекту, в настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, которые содержат наночастицу, экспонирующую модифицированный полипептид

эктодомена E2 HCV, описанный в настоящей заявке, и, необязательно, фармацевтически приемлемый носитель.

- 5 [0012] Согласно еще одному аспекту, в настоящем изобретении предложены способы лечения или предотвращения инфекции, вызванной HCV, у субъекта, страдающего или подверженного риску развития инфекции, вызванной HCV. Данные способы согласно настоящему изобретению предусматривают введение указанному субъекту фармацевтической композиции, которая содержит полипептид модифицированного эктодомена E2 HCV, описанный в настоящей заявке, или вакцины на основе наночастицы, содержащей полипептид.
- 10 [0013] Последующее понимание природы и преимуществ настоящего изобретения может быть достигнуто посредством ссылки на оставшиеся части описания и формулу изобретения.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

- 15 [0014] На Фиг. 1 показан рациональный дизайн кора E2 HCV. (A) Схематическое представление E2 HCV (аминокислоты 384-746), демонстрирующее структурные компоненты: переменные области (VR), антигенный сайт 412 (AS412), передний слой, β -сэндвич, связывающую петлю CD81, задний слой, трансмембранную область стебля (TM) и *N*-связанные
- 20 гликаны и консервативные дисульфидные связи. Показано выравнивание последовательностей сконструированных областей между E2 и E2mc3 (см. ниже). Показаны последовательности области VR2 с нарушением порядка (остатки 452-494) (SEQ ID NO:5) и β -сэндвич-петли (остатки 540-550) (SEQ ID NO:21) изолята H77 HCV. (B) Дизайн на основе структуры минимального кора E2. Слева:
- 25 структура H77 E2c (идентификационный номер PDB: 4MWF) с укороченной петлей VR2, смоделированной программой LOOPY для прогнозирования петли. β сэндвич-петля с измененным дизайном и укороченная область VR2 с нарушением порядка окрашены в пурпурный цвет. Показаны дисульфидные связи C494-C564 и C452-C620, которые заякоривают VR2 к заднему слою.
- 30 Передний слой, связывающая петля CD81 и задний слой также показаны. Середина 1: Структура H77 E2mc3 с β -сэндвич петлей с усеченным кончиком и дополнительно усеченной VR2 областью с нарушением порядка (tVR2). Середина 2: график среднеквадратичных колебаний (RMSF) для ансамбля tVR2 с

измененным дизайном показан ниже с основными стадиями, участвующими в разработке белка на основе ансамбля *de novo*. Справа: Структура Н77 Е2мс3 с пятью наилучшими вариантами конструкции tVR2 (Е2мс3 v1-v5), выделенными в прозрачной молекулярной поверхности. (С) Профили SEC Е2мс3 и вариантов.

5 Слева: Н77 Е2мс3, v1-v5 и v6-v10. Справа: НК6а Е2мс3 и v1. (D) SDS-PAGE-электрофорез Е2мс3 и варианты (слева: Н77; справа: НК6а). (Е) Значения ЕС₅₀ коров Е2 Н77 (верхняя панель) и НК6а (нижняя панель), связывающихся с 12 антителами HCV, включая восемь bNAb (НСV1, НС33, НС84.1, АR3С, НЕРС3, НЕРС74, 212.1.1 и НС1АМ), один NAb (АR2А) и три не-NAb (АR1А, АR1В и Е1).

10 Протестированные в настоящей заявке коры Е2 включают варианты Е2с3, Е2мс3 и Е2с3 (10 для Н77 и 1 для НК6а). (F) Аффинности связывания (K_d) вариантов Н77 и НК6а Е2мс3 для шести выбранных антител к HCV. (G) Тепловая стабильность вариантов Н77 и НК6а Е2с3 и Е2мс3, измеренная с помощью ДСК. Два тепловых параметра, T_m и $\Delta T_{1/2}$, перечислены для четырех коров Е2 Н77 и

15 трех коров Е2 НК6а.

[0015] На Фиг. 2 показаны структуры рационально сконструированных коров HCV Е2. (А) Кристаллические структуры Н77/НК6а Е2мс3 указывают на общую укладку, аналогичную Н77 Е2с и НК6а Е2с3 (PDB: 4MWF и 6ВКВ). (В) Наложение β -сэндвич петли из структуры Н77 Е2мс3-v1 на комплекс НК6а Е2с3-Fab Е1, подтверждающее, что потеря связывания Е2мс3s с Fab Е1 происходит в результате усечения β -сэндвич петли. (С) Наложение Е2 НК6а Е2с3 (PDB 6ВКВ), Н77 Е2мс3-v1, Н77 Е2мс3-v6 и НК6а Е2мс3-v1 на структуру Н77 Е2с (PDB 4MWF), иллюстрирующую конформацию tVR2 с измененным дизайном (т. е. 452-494). Области tVR2 с измененным дизайном структур Н77 Е2мс3-v1 и НК6а

20 Е2мс3-v1 полностью смоделированы, но только частично в структуре Н77 Е2мс3-v6. (D) Наложение структур Н77/НК6а Е2мс3 на Н77 Е2с и НК6а Е2с3, что указывает на сходную конформацию поверхности нейтрализации с только локальными конформационными изменениями для VR2 Е2 с измененным дизайном.

30 **[0016]** На Фиг. 3 показан рациональный дизайн самособирающихся наночастиц, содержащих кор Е2. (А) Схематическое представление вириона HCV (вверху) и вакцины на основе наночастиц на основе кора Е2 (внизу). Для вириона HCV отмечены одноцепочечные (SS)-РНК, капсид, мембрана и гликопротеины

оболочки E1 и E2, в то время как для вакцины отмечены оптимизированный кор
E2 и носитель на основе наночастиц. (B) Окрашенные поверхностные модели
носителей на основе наночастиц (вверху) и вакцин на основе наночастиц на
основе кора E2 (внизу). Три носителя на основе наночастиц, показанные в
5 настоящей заявке, представляют собой 24-мерный ферритин (FR) и 60-мерные
E2p и I3-01. Размер наночастиц указан по диаметру (в нанометрах). (C) Профили
SEC наночастиц H77 E2mc3-v1, полученных с помощью колонки Superose 6
10/300 GL. Фракция частиц обозначена пунктирной линией. В то время как
наночастицы FR и I3-01 получали в клетках ExpiCHO, наночастицы E2p
10 экспрессировали в клетках HEK293 F. (D) BN-PAGE наночастиц H77 E2mc3-v1,
очищенных SEC. (E) ЭМ-изображения с негативным окрашиванием наночастиц
H77 E2mc3-v1, очищенных SEC. (F) Значения EC₅₀ наночастиц H77 (верхняя
панель) и НК6а (нижняя панель) E2mc3-v1, связывающихся с 12 антителами к
HCV, перечисленными на Фиг. 7C. (G) Антигенные профили H77 (слева) и НК6а
15 (справа) E2mc3-v1 и три наночастицы против шести антител к HCV.
Сенсограммы были получены из Octet RED96 с использованием серии
титрования антигена шести концентраций (3,57-0,11 мкМ двукратным
разведением для E2mc3-v1 и 52,08-1,63 нМ двукратным разведением для
наночастиц) и биосенсоров количественного определения, как показано на Фиг.
20 10H и I. Значения пиков при наивысшей концентрации перечислены в матрице.
Более высокая интенсивность цвета указывает на больший сигнал связывания,
измеренный с помощью Octet.

[0017] На Фиг. 4 показана иммуногенность новых сконструированных коров
E2 и наночастиц у мышей. (A) Схематическое представление протокола
25 иммунизации мышей. В исследовании №1 мышей иммунизировали H77 E2mc3-
v1 (группа 1), H77 E2mc3-v1-10GS-FR (группа 2) и H77 E2mc3-v1-10GS-E2p
(группа 3). В исследовании №2 мышей иммунизировали НК6а E2mc3-v1 (группа
1), НК6а E2mc3-v1-10GS-E2p (группа 2), и смесью НК6а/H77 E2mc3-v1-10GS-
E2p (группа 3). (B) Продольный анализ титров E2-специфичных антител в
30 иммунизированных сыворотках мышей на неделях 2, 5, 8 и 11. Верхняя панель:
Значения EC₅₀, рассчитанные по связыванию сывороток мышей методом ELISA в
исследовании №1 с антигеном оболочки H77 E2mc3-v1. Нижняя панель: Значения
EC₅₀, рассчитанные по связыванию сывороток мышей методом ELISA в

исследовании №2 с антигенами оболочки НК6а E2mc3-v1 (группы 1-3) и H77 E2mc3-v1 (группа 3). Значения P определяли с помощью непарного t -критерия в Prism и отмечали на графиках знаком (*), указывающим на уровень статистической значимости. Подробные данные ELISA сыворотки показаны на

5 Фигуре 11, A-D. (C) Нейтрализация сыворотки мыши в исследовании №1. Верхняя панель: Процент (%) нейтрализации сывороток мыши против аутологичного H77 на неделях 2, 5, 8 и 11. Нижняя панель: Процент (%) нейтрализации сывороток мыши против гетерологичных HCV1, J6 и SA13 в последний момент времени, неделя 11. (D) Нейтрализация сыворотки мыши в

10 исследовании №2. Процент (%) нейтрализации сывороток мыши против гетерологичного H77 на неделях 2, 5, 8 и 11. (E) Валидация анализа нейтрализации псевдотипированных частиц (HCVpp) HCV с использованием пяти bNAb HCV и bNAb ВИЧ-1 (отрицательный контроль). Процент (%) нейтрализации всех антител определяли при трех концентрациях: 10,0 мкг/мл, 1,0

15 мкг/мл и 0,1 мкг/мл.

[0018] На Фиг. 5 показаны паттерны, связанные с В-клеточным ответом, специфичным для HCV E2, при иммунизации мышей. (A) Схематическое представление стратегии, используемой для анализа E2-специфичного В-клеточного ответа HCV, который сочетает антиген-специфичную объемную

20 сортировку В-клеток селезенки с секвенированием следующего поколения (NGS) и анализом антител (antibodyomics). (B) Статистический анализ данных сортировки В-клеток, полученных для группы 1 (мономер H77 E2mc3-v1) и группы 3 (наночастица H77 E2mc3-v1-10GS-E2p) в исследовании №1. Слева: частота E2-специфичных В-клеток. Справа: Количество E2-специфичных В-

25 клеток на миллион клеток селезенки. Пять мышей из группы 1 (M1, M3, M5, M6 и M10) и пять мышей из группы 3 (M5, M7, M8, M9 и M10) были выбраны случайным образом и проанализированы. (C) Распределение использования генов зародышевой линии, построенное для группы 1 и группы 3. Верхняя панель: Гены зародышевой линии V_H . Нижняя панель: Гены зародышевой линии V_K .

30 Статистический анализ количества активированных генов V_H/V_K ($\geq 1\%$ от общей популяции) приведен в крайнем правом углу. (D) График распределения расхождения зародышевой линии или степени соматической гипермутации (SHM) для групп 1 и 3. Для каждой группы рассчитывали процент (%) мутации

на уровне нуклеотидов (nt) для V_H (слева) и V_K (справа). Статистический анализ расхождения зародышевой линии приведен в крайнем правом углу. (E) Распределение длины петли CDR3, построенной для групп 1 и 3. Для каждой группы показана длина CDR3, рассчитанная на уровне аминокислоты (а.к.) для тяжелых (слева) и легких цепей (справа). Статистический анализ

5 среднеквадратической флуктуации (СКФ) длины петли CDR3, который используется в качестве показателя того, насколько длина петли CDR3 варьируется в пределах E2-специфичных антител у каждого животного. (F) Кривые нейтрализации с использованием очищенного IgG для групп 1 (слева) и 3

10 (справа) в исследовании №1. Аутологичный H77 (1a) и гетерологичный SA13 (5a) тестировали в анализах HCVpp с начальной концентрацией IgG 100мкг/мл с последующей серией трехкратных разведений. Структурные модели иммуногенов размещены рядом с их кривыми нейтрализации. (G) Эпитопное картирование сывороток поликлональных антител из групп 1 и 3 в исследовании

15 №1. Поверхностная модель усеченного эктодомена E2 (E2_{ECTO}) (PDB: 6MEI) показана посередине с передним слоем (FL) и AS412. Статистический анализ титров EC₅₀ групп 1 и 3 по отношению к зонду FL (слева) и зонду AS412 (справа). Структурные модели сконструированных зондов на основе наночастиц размещены рядом с их графиками. Эпитопы на наночастицах окрашены в

20 соответствии с моделью усеченного E2_{ECTO} (PDB: 6MEI).

[0019] На Фиг. 6 показан последовательный, структурный и расчетный анализ вариантов конструкции гликопротеина E2 и кора E2 оболочки HCV. (A) Выравнивание последовательностей конструкций H77 E2ΔTM, E2c, E2c3 и E2mc3 (SEQ ID NO:1-4, соответственно). Области HVR1, VR2, VR3 и β-сэндвич петли отмечены линиями. Мутации E2c и E2c3 помечены, а мутации E2mc3 отмечены стрелками. (B) Структуры H77 E2c (PDB: 4MWF) и 1b09 усеченного эктодомена E2 (PDB: 6MEI). Белковая цепь представлена в виде трубки с цветной молекулярной поверхностью, как показано на Фиг. 1A. (C) Структура НК6а E2c3, связанного с E1 и AR3A. Показаны молекулярные поверхности НК6а E2c3, E1 и

30 AR3A. Крупный план четырех E1-взаимодействующих аминокислот на конце β-сэндвич петли показан в виде вставки. (D) Проекция эпитопа E1 на структуру E2c3. Слева: задний слой, β-сэндвич петля и связывающая петля CD81 показаны в виде трубок внутри прозрачной молекулярной поверхности. Кончик β-сэндвич

петли отмечен прямоугольником; Справа: E1-взаимодействующие аминокислоты помечены на твердой молекулярной поверхности E2. (E) Схематический обзор взаимодействий между E1 mAb HC и LC CDR (SEQ ID NO:44-49, соответственно) и E2. E2-взаимодействующие остатки выделены для водородных связей и гидрофобных взаимодействий. (F) Конформационные ансамбли петли E2mc3 tVR2 с измененным дизайном. Структура E2mc3 показана лентами и 1000 смоделированных петель. Слева: длина петли №1 (13 а.к.) (SEQ ID NO:50); справа: длина петли №2 (12 а.к.) (SEQ ID NO:51). (G) Распределение $S\alpha$ среднеквадратических (СК) колебаний, нанесенных на график для двух ансамблей петель tVR2 с измененным дизайном. (H) Пять лучших дизайнов и их энергетические показатели для двух ансамблей петель. Показанные последовательности представляют собой последовательность tVR2 E2mc3 (SEQ ID NO:10) и последовательности 10 фрагментов (SEQ ID NO:11-20, соответственно), которые заменяют мотив PERASG (SEQ ID NO:52) в последовательности tVR2. (I) Выравнивание последовательностей H77 E2, H77 E2c и НК6а E2c3 (SEQ ID NO:53-55, соответственно). Отмечены аминокислоты, которые имеют нарушенный порядок в кристаллических структурах комплексов H77 E2c-AR3C (PDB: 4MWF) и НК6а E2c3-AR3A (PDB: 6BKB).

[0020] На Фиг. 7 показана биохимическая, биофизическая и антигенная характеристика коров E2, полученных из H77(1a) и НК6а(6a). (A) Профили SEC белков E2c3, полученных из колонки Superdex 200 10/300 после иммуноаффинной (AR3A) очистки. (B) SDS-PAGE белков E2c3 и E2mc3 после иммуноаффинной очистки (AR3A) и очистки SEC. (C) Антигенные сайты и эпитопы, нанесенные на поверхность H77 E2c (перечислены публикации). (D) Связывание вариантов H77 E2c3 и E2mc3 с 12 HCV-специфичными антителами с помощью ELISA. (E) Значения EC_{50} конструкций коров E2 H77, связывающихся с 12 HCV-специфичными антителами. (F) Связывание вариантов НК6а E2 E2c3 и E2mc3 с 12 HCV-специфичными антителами. (G) Значения EC_{50} конструкций коров E2 НК6а, связывающихся с 12 HCV-специфичными антителами. В (E) и (G) значения EC_{50} были рассчитаны для всех графиков ELISA в Prism, за исключением случаев, когда наибольшее значение OD_{450} было ниже 0,1 или подбор данных был неоднозначным. (H) Октетное связывание вариантов H77 E2mc3 с шестью HCV-специфичными антителами. (I) Октетное связывание

вариантов НК6а E2mc3 с шестью HCV-специфичными антителами. В (H) и (I) сенсограммы были получены с помощью прибора Octet RED96 с использованием серии титрования шести концентраций (3,57-0,11 мкМ путем двукратного разведения для всех вариантов E2mc3) и биосенсоров кинетики (см. Способы). (J)

5 Значения K_D вариантов H77 и НК6а E2mc3, измеренные с помощью Octet. (K) Кривые дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) выбранных конструкций кора E2. Два тепловых параметра, T_m и $T_{1/2}$, отмечены на профилях ДСК.

[0021] На Фиг. 8 показаны кристаллические структуры H77 E2mc3 и НК6а E2mc3. (A) Конформационная гибкость петли 430-438 переднего слоя. Петля 430-438 в структурах H77 и НК6а E2c приобретает различные конформации, но поддерживает сходные взаимодействия с петлей Fab CDRH3, что указывает на высокую гибкость этой области. (B) Конформация области β -сэндвич петли (а. к. 540-550) в H77 E2c, НК6а E2c3 и H77/НК6а E2mc3.

15 **[0022]** На Фиг. 9 показан структурный анализ области tVR2 с измененным дизайном. (A) $2F_O-F_C$ и несмещенные карты электронной плотности области VR2 с измененным дизайном (1σ или $0,9\sigma$, соответственно). (B) Внутренние взаимодействия области tVR2 с измененным дизайном H77 E2mc3-v1, H77 E2mc3-v6 и НК6а E2mc3-v1 с областями VR3 и post VR3 (а. к. 570-597). (C) Сравнение H77 E2mc3-v1 и НК6а E2mc3-v1, указывающее на изменения конформации областей VR2 с измененным дизайном и соседнего VR3-обратного слоя (т. е. 565-608). (D) В кристаллической структуре усеченного эктодомена 1b09 E2 (слева) полноразмерный VR2 обертывается вокруг VR3 с образованием переменной поверхности. Наложение структуры H77 E2mc3-v1 на 1b09 E2 указывает только на незначительное влияние изменения дизайна VR2 на общую укладку E2 (как показано выравниванием C452 и C494).

25 **[0023]** На Фиг. 10 показана биохимическая, биофизическая и антигенная характеристика наночастиц с кором E2, полученных из H77(1a) и НК6а(6a). (A) Профили SEC наночастиц НК6а E2mc3-v1 на основе FR, E2p и I3-01, полученных с помощью колонки Superose 6 200 Increase 10/300 после иммуноаффинной (AR3A) очистки. (B) BN-PAGE наночастиц НК6а E2mc3-v1 на основе FR, E2p и I3-01. (C) ЭМ-изображения с негативным окрашиванием наночастиц НК6а E2mc3-v1 на основе FR, E2p и I3-01. (D) Связывание наночастиц H77 E2c3-v1 с 12

НСV-специфичными антителами. (E) Значения EC_{50} наночастиц Н77 Е2 Е2с3- v_1 , связывающихся с 12 НCV-специфичными антителами. (D) Связывание наночастиц НК6а Е2мс3- v_1 с 12 НCV-специфичными антителами. (G) Значения EC_{50} наночастиц НК6а Е2мс3- v_1 с 12 НCV-специфичными антителами. В (E) и 5 (G) значения EC_{50} были рассчитаны для всех графиков ELISA в Prism, за исключением случаев, когда наибольшее значение OD_{450} было ниже 0,1 или подбор данных был неоднозначным. (H) Октетное связывание наночастиц Н77 Е2мс3- v_1 с шестью НCV-специфичными антителами. (I) Октетное связывание наночастиц НК7а Е2мс3- v_1 с шестью НCV-специфичными антителами. В (H) и 10 (I) сенсограммы получали из прибора Octet RED96 с использованием серии титрования шести концентраций (3,57-0,11 мкМ двукратным разведением для Е2мс3- v_1 и 52,08-1,63 нМ двукратным разведением для наночастиц Е2мс3- v_1) и биосенсоров количественного определения.

[0024] На Фиг. 11 показан ответ антител мыши во время иммунизации на w2, 15 w5, w8 и w11. (A) связывание с помощью ELISA Н77 Е2мс3- v_1 с сыворотками мышей из групп 1, 2 и 3 в исследовании №1, которые были иммунизированы Н77 Е2мс3- v_1 , Е2мс3- v_1 -10GS-FR и Е2мс3- v_1 -10GS-E2p, соответственно, в четыре момента времени. (B) Значения EC_{50} в исследовании №1 связывания сывороток мышей с Н77 Е2мс3- v_1 в четырех временных точках. (C) связывание с помощью 20 ELISA НК6а Е2мс3- v_1 или Н77 Е2мс3- v_1 с сыворотками мышей из групп 1, 2 и 3 в исследовании №2, которые были иммунизированы смесью НК6а Е2мс3- v_1 , НК6а Е2мс3- v_1 -10GS-E2p и Н77/НК6а Е2мс3- v_1 -10GS-E2p, соответственно, в четыре момента времени. Панели 1 и 2: сыворотки мышей, иммунизированных НК6а Е2мс3- v_1 (группа 1) и НК6а Е2мс3- v_1 -10GS-E2p (группа 2), тестировали 25 против НК6а Е2мс3- v_1 . Панели 3 и 4: сыворотки мышей, иммунизированных смесью Н77/НК6а Е2мс3- v_1 -10GS-E2p (группа 3), тестировали относительно Н77 Е2мс3- v_1 (панель 3) и НК6а Е2мс3- v_1 (панель 4). (D) Значения EC_{50} в исследовании №2 связывания сывороток мышей с Н77 Е2мс3- v_1 в четырех временных точках.

30 **[0025]** На Фиг. 12 показан анализ секвенирования следующего поколения (NGS) объемно-сортированных Е2мс3-специфичных В-клеток селезенки мыши. (A) Профиль SEC биотинилированного Avi-меченого Н77 Е2мс3- v_1 , называемого Е2мс3- v_1 -Avi-Biot, полученного с помощью колонки Superdex 200 10/300, с

пиком, соответствующим биотин-лигазе, меченной на профиле. (B) Краткое описание H77 E2mc3-v1-специфичной объемной сортировки В-клеток селезенки мышей из исследования №1, группы 1 и 3. (C) Анализ данных NGS антител, полученных для E2mc3-v1-сортированных В-клеток селезенки мыши. Были проанализированы данные NGS для групп 1 и 3, всего 10 мышей.

[0026] На Фиг. 13 показан анализ ответа поликлональных антител мыши в сыворотке. (A) Нейтрализация изолятов H77 и SA13 HCV с помощью IgG мыши, очищенного из группы H77 E2mc3-v1-10GS-FR в исследовании №1. Анализы нейтрализации HCVpp проводили с начальной концентрацией IgG 100 мкг/мл и серией 3-кратных разведений. Кривые полной нейтрализации были созданы для облегчения сравнения между различными группами. (B) Конструкция эпитоп-специфичных зондов для переднего слоя (FL) (SEQ ID NO:56-58) и AS412 (SEQ ID NO:59-61). Слева: конструкция эпитоп-каркаса, показывающая выравнивание последовательностей эпитопа, сконструированного эпитоп-каркаса и оригинального каркаса, полученного из поиска по базе данных (* – совпадение и • – аналогично сконструированным дисульфидным связям); посередине: структурная модель сконструированного эпитоп-каркаса, с структурой каркаса, показанной в тап и эпитопах FL и AS412. Справа: молекулярная модель зонда на основе наночастиц, с эпитопами FL и AS412. (C) связывание ELISA сывороток мышей из групп 1 и 3 в исследовании №1, которые были иммунизированы H77 E2mc3-v1 и E2mc3-v1-10GS-E2p, соответственно, с двумя зондами эпитопа. Слева: кривые ELISA; справа: суммарные данные титров EC₅₀.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

25 I Общий обзор

[0027] Гликопротеины E1 и E2 образуют гетеродимер на оболочке HCV, опосредующий проникновение вируса в гепатоциты хозяина. E2 взаимодействует с рецепторами клетки-хозяина CD81 и SR-B1 и является основной мишенью для нейтрализующих антител (NAb). Кристаллические структуры кора E2 (E2c) из изолята H77 (генотип 1a) с нейтрализующим антителом широкого спектра действия (bNAb), AR3C и усеченного E2 из изолята J6 (генотип 2a), связанного с не-NAb, 2A12, дали первое представление об иммунном распознавании гликопротеинов оболочки HCV и проложили путь для структурного

проектирования противовирусных лекарственных средств и вакцин. Были исследованы различные стратегии вакцин, такие как вирусные векторы, ДНК-вакцины, вирусоподобные частицы (VLP) и рекомбинантные белки E2 и E1E2, но не существует лицензированной вакцины для предотвращения HCV-инфекции.

5 Хотя рекомбинантные гликопротеины E1, E2 и E1E2 вызывали NAb у животных и людей, широта нейтрализации была ограничена и была направлена главным образом на иммунодоминантные переменные петли. Поэтому усилия по вакцинации против HCV должны быть сосредоточены на разработке и оптимизации антигенов на основе гликопротеина оболочки, способных вызывать
10 ответ bNAb.

[0028] За последнее десятилетие несколько рациональных стратегий разработки вакцины для вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ) включали подходы, ориентированные на эпитопы и основанные на нативных тримерах Env, которые нацелены на направление иммунного ответа на эпитопы
15 bNAb либо путем прививки эпитопа на гетерологичные каркасы, удаления или подавления иммунодоминантных областей, либо путем стабилизации структур Env. Другим крупным достижением была разработка самособирающихся наночастиц (NP) для презентации стабилизированных тримеров Env и эпитоп-каркасов в виде мультивалентных вакцин на основе VLP. Эти общие элементы
20 конструкции можно, в принципе, применять к широкому спектру мишеней вакцины, включая HCV. Действительно, были сконструированы эпитоп-каркасы для консервативных эпитопов NAb E1 и E2, но без зарегистрированных данных *in vivo* или незначительного улучшения в широте нейтрализации. См., например, He *et al.*, *Sci. Rep.* **5**, 12501, 2015; Pierce *et al.*, *J. Virol.* **91**, e01032-01017, 2017; и
25 Sandomenico *et al.*, *J. Virol.* **90**, 3745-3759, 2016.

[0029] Настоящее изобретение частично основано на исследованиях авторов изобретения для изменения дизайна полипептидов вакцины на основе E2 против HCV. Более конкретно, авторы настоящего изобретения сначала изменили дизайн конструкций на основе кора E2 путем усечения области VR2 с
30 нарушением порядка и β -сэндвич петли, а затем провели компьютерную оптимизацию усеченной петли VR2 (tVR2). Было обнаружено, что модифицированные полипептиды E2 HCV имеют улучшенный выход, более высокую чистоту и повышенную термостабильность. Они также обладают более

сильным связыванием с нейтрализующими антителами широкого спектра действия и сниженным связыванием с антителами, отличными от нейтрализующих антител. Авторы настоящего изобретения дополнительно экспонировали полипептиды E2 HCV с измененным дизайном на наночастицах различных размеров. Полученные композиции вакцин на основе наночастиц также продемонстрировали значительный выход, высокую чистоту и повышенную антигенность. Кроме того, мышей иммунизировали конструкциями вакцин на основе наночастиц, а продольный анализ сыворотки подтвердил превосходную иммуногенность вакцин на основе наночастиц. Кроме того, был проведен статистический анализ для проверки данных *in vivo*, что обеспечило надежную основу для будущего сравнения различных типов вакцин-кандидатов на вакцину против гепатита С.

[0030] Согласно данным исследованиям, в настоящем изобретении предложены новые иммуногенные полипептиды HCV, которые получены из сконструированных или имеющих измененный дизайн полипептидов кора E2 HCV, описанных в настоящей заявке. Также в настоящем изобретении предложены композиции вакцины против HCV, содержащие платформу для экспонирования, включающую самособирающуюся наночастицу, которая экспонирует один или более полипептидов E2 HCV с измененным дизайном. В настоящем изобретении также предложены варианты терапевтического применения полипептидов E2 HCV с измененным дизайном и соответствующих композиций вакцин на основе наночастиц, например, для лечения или предотвращения инфекций HCV.

[0031] Если в настоящей заявке не указано обратное, иммуногены вакцины согласно настоящему изобретению, кодирующие полинуклеотиды, векторы экспрессии и клетки-хозяева, а также связанные с ними варианты терапевтического применения могут быть получены или осуществлены в соответствии с процедурами, примеры которых представлены в настоящей заявке, или посредством общепринято используемых способов, хорошо известных в данной области техники. См., например, руководства *Methods in Enzymology, Volume 289: Solid-Phase Peptide Synthesis*, J. N. Abelson, M. I. Simon, G. B. Fields (Editors), Academic Press; 1st edition (1997) (ISBN-13: 978-0121821906); патенты США №№ 4,965,343 и 5,849,954; Sambrook et al., *Molecular*

Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y., (3rd ed., 2000); Brent et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (ringbou ed., 2003); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1986); или Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol. 152, S. L. Berger and A. R. Kimmerl Eds., Academic Press Inc., San Diego, USA (1987); Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, et. al., ed., John Wiley and Sons, Inc.), Current Protocols in Cell Biology (CPCB) (Juan S. Bonifacino et. al. ed., John Wiley and Sons, Inc.) и Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss; 5th edition (2005), Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, Vol. 57, Jennie P. Mather and David Barnes editors, Academic Press, 1st edition, 1998). Следующие далее разделы обеспечивают дополнительное руководство для создания и осуществления на практике композиций и способов согласно настоящему изобретению.

15

II. Определения

[0032] Если иное не указано, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют такое же значение, как обычно понимается специалистами в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Следующие ссылки обеспечивают для специалиста в данной области техники общее определение многих терминов, используемых согласно настоящему изобретению: *Academic Press Dictionary of Science and Technology*, Morris (Ed.), Academic Press (1st ed., 1992); *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*, Smith et al. (Eds.), Oxford University Press (revised ed., 2000); *Encyclopaedic Dictionary of Chemistry*, Kumar (Ed.), Anmol Publications Pvt. Ltd. (2002); *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, Singleton et al. (Eds.), John Wiley & Sons (3rd ed., 2002); *Dictionary of Chemistry*, Hunt (Ed.), Routledge (1st ed., 1999); *Dictionary of Pharmaceutical Medicine*, Nahler (Ed.), Springer-Verlag Telos (1994); *Dictionary of Organic Chemistry*, Kumar and Anandand (Eds.), Anmol Publications Pvt. Ltd. (2002); and *A Dictionary of Biology (Oxford Paperback Reference)*, Martin and Hine (Eds.), Oxford University Press (4th ed., 2000).
Дополнительные пояснения некоторых из указанных терминов при их

использовании применительно конкретно к настоящему изобретению предложены в настоящей заявке.

[0033] В настоящей заявке формы единственного числа означают как единственное, так и множественное число, если контекст однозначно не диктует обратное. Например, «полученный из E_nV тример» может означать одну или несколько молекул полученного из E_nV тримера и может считаться эквивалентным фразе «по меньшей мере один полученный из E_nV тример».

[0034] В настоящей заявке термины «антиген» или «иммуноген» используются взаимозаменяемо для обозначения вещества, как правило, белка, способного к индукции иммунного ответа у субъекта. Термин также относится к белкам, которые являются иммунологически активными в том смысле, что при введении субъекту (непосредственно или путем введения указанному субъекту нуклеотидной последовательности или вектора, который кодирует белок, они способны вызывать иммунный ответ гуморального и/или клеточного типа, направленный против указанного белка. Если иное не указано, термин «иммуноген вакцины» используется взаимозаменяемо с терминами «белковый антиген» или «иммуногенный полипептид».

[0035] Термин «консервативно модифицированный вариант» применяется как к аминокислотным последовательностям, так и последовательностям нуклеиновых кислот. В случае конкретных последовательностей нуклеиновых кислот консервативно модифицированные варианты относятся к таким нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или в случае, когда нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, к по существу идентичным последовательностям. Из-за вырожденности генетического кода любой конкретный белок кодируется большим количеством функционально идентичных нуклеиновых кислот. В случае полипептидных последовательностей «консервативно модифицированные варианты» относятся к варианту, который имеет консервативные аминокислотные замены, аминокислотные остатки, замещенные другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь со сходным зарядом. Семейства аминокислотных остатков, имеющих боковые цепи со сходными зарядами, были определены в данной области техники. Указанные семейства включают аминокислоты с

основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

[0036] Эпитоп относится к антигенной детерминанте. Эпитоп представляет собой конкретные химические группы или пептидные последовательности на молекуле, которые являются антигенными, то есть, вызывают специфичный иммунный ответ, например, эпитоп представляет собой область антигена, на которую отвечают В- и/или Т-клетки. Эпитопы могут быть образованы из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, которые сблизились в результате образования третичной структуры белка.

[0037] Эффективное количество вакцины или другого средства является достаточным для образования желаемого ответа, такого как снижение или устранение признака либо симптома состояния или заболевания, такого как вирусная инфекция. Например, эффективное количество может представлять собой количество, необходимое для ингибирования вирусной репликации или для измеримого изменения внешних симптомов вирусной инфекции. В целом, указанное количество является достаточным для измеримого ингибирования репликации или инфекционной активности вируса (например, HCV). При введении субъекту, как правило, будет применяться доза, которая позволит достичь целевой концентрации, которая, как было показано, является достаточной для ингибирования репликации вируса *in vitro*. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, термин «эффективное количество» представляет собой количество, которое обеспечивает лечение (включая профилактику) одного или более симптомов и/или причин, лежащих в основе любого из расстройства или заболевания, например лечение инфекции, вызванной HCV. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, эффективное количество представляет собой терапевтически эффективное количество. Согласно некоторым вариантам реализации

настоящего изобретения, эффективное количество представляет собой количество, которое предотвращает развитие одного или более признаков или симптомов конкретного заболевания или состояния, таких как один или более признаков или симптомов, связанных со инфекцией HCV.

5 **[0038]** В настоящей заявке слитый белок представляет собой рекомбинантный белок, содержащий последовательность аминокислот из по меньшей мере двух неродственных белков, которые были объединены посредством пептидной связи для получения одного белка. Неродственные последовательности аминокислот можно объединить напрямую друг с другом
10 или их можно объединить с применением последовательности линкера. В настоящей заявке белки являются неродственными, если их последовательности аминокислот в норме не обнаруживаются соединенными посредством пептидной связи в их природном окружении или окружениях (например, внутри клетки). Например, аминокислотные последовательности бактериальных ферментов,
15 таких как дигидролипоилацилтрансфераза (E2p) *B. stearothermophilus*, и аминокислотные последовательности гликопротеинов E2 HCV в норме не встречаются в связанном с помощью пептидной связи виде.

[0039] В настоящей заявке «E1» относится к гликопротеину оболочки вируса гепатита С. Полипептид E1 расположен в полипротеине HCV сразу после белка
20 кора в аминокислотных остатках, соответствующих остаткам 192-383 полипротеина изолята H77 генотипа 1a HCV.

[0040] В настоящей заявке гликопротеин 2 оболочки HCV (E2) относится к гликопротеину оболочки на вирусе гепатита С. E2 представляет собой трансмембранный белок I типа с аминоконцевым эктодоменом, соединенным с
25 карбокси-концевой трансмембранной спиралью через амфипатический, α -спиральный стебель. Полипептид E2 расположен в полипротеине HCV непосредственно после полипептида E1 в аминокислотных остатках, соответствующих остаткам 384-746 (SEQ ID NO:1) изолята H77 генотипа 1a HCV. См., например, Goffard et al., *Biochimie* 85, 295-301, 2003. Если не указано иное,
30 ссыла на полипептид E2 в данной заявке также включает его усеченные формы, такие как растворимые формы, которые усечены на своем С-конце для удаления трансмембранного домена, которые сохраняют свойство, такое как связывающее свойство, и варианты, такие как те, которые принадлежат различным изолятам и

квазивидам HCV, включая полипептиды, которые имеют по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с полипептидом E2 из HCV генотипа 1a, причем изолят H77, приведен в SEQ ID NO:1.

5 **[0041]** Если иное не указано, полипептиды E2 включают синтетические молекулы, полученные путем трансляции нуклеиновых кислот, белки, полученные путем химического синтеза, такого как синтез, который включает лигирование более коротких полипептидов с помощью рекомбинантных способов, белки, выделенные из инфицированных HCV тканей и клеток человека
10 и не человека, химерные полипептиды E2 и их модифицированные формы. Полипептиды E2 также включают фрагменты или части E2, которые имеют достаточную длину или содержат соответствующие области, чтобы сохранить по меньшей мере одно свойство полноразмерного полипептида E2, такое как способность связываться с антителами к E2. Полипептиды E2 также включают
15 те, которые содержат химические или посттрансляционные модификации, и те, которые не содержат химических или посттрансляционных модификаций. Такие модификации включают, но не ограничиваются ими, пегилирование, альбуминирование, гликозилирование, фарнизилрование, карбоксилирование, гидроксिलирование, фосфорилирование и другие полипептидные модификации,
20 известные в данной области техники.

[0042] В настоящей заявке эктодомен E2 HCV (E2_{ECTO} или E2 Δ TM) относится к растворимой части полипептида E2, которая находится вне вирусной мембраны, то есть к N-концевой части белка E2, которая не включает трансмембранную спираль. В прототипе H77 изолята E2 Δ TM или E2_{ECTO} состоит
25 из аминокислот 384-717 (SEQ ID NO:2) и стабилизируется девятью консервативными дисульфидными связями. Он содержит три переменные области, включая гиперпеременную область 1 (HVR1, а. к. 384-411), VR2 (а. к. 460-484) и VR3 (а. к. 570-580), и покрыт ~11 N-связанными гликанами. В настоящей заявке область VR2 с нарушением порядка относится к конкретному
30 фрагменту E2, который охватывает VR2 и граничит с двумя остатками цистеина, которые образуют две дисульфидные связи для закрепления к заднему слою и β -сэндвич домену, соответственно. В изоляте H77 область VR2 с нарушением

порядка соответствует остаткам 452-494, и две заякоривающие дисульфидные связи представляют собой C452-C620 и C494-C564.

5 **[0043]** В настоящей заявке ссылка на положение аминокислот в любом из зрелых процессированных белков HCV, таких как E2, приведена с нумерацией относительно полноразмерного полипептида HCV, а не со ссылкой на зрелый полипептид. Так, например, со ссылкой на положение аминокислоты 425 в полипептиде E2 из генотипа 1a HCV, изолят H77 соответствует положению 42 зрелого полипептида E2, представленному в SEQ ID NO:1.

10 **[0044]** В настоящей заявке соответствующие остатки относятся к остаткам, которые встречаются в выровненных локусах. Родственные или варианты полипептиды выравнивают с помощью любого способа, известного специалистам в данной области техники. Такие способы, как правило, максимизируют совпадения и включают такие способы, как использование ручного выравнивания и использование многочисленных доступных программ выравнивания (например, 15 BLASTP), и других, известных специалистам в данной области техники. Выравнивая последовательности полипептидов, специалист в данной области техники может идентифицировать соответствующие остатки, используя консервативные и идентичные аминокислотные остатки в качестве ориентиров. Например, путем выравнивания последовательностей полипептидов E2 из 20 различных изолятов HCV специалист в данной области техники может идентифицировать соответствующие остатки, используя консервативные и идентичные аминокислотные остатки в качестве ориентиров. Соответствующие положения также могут быть основаны на структурных выравниваниях, например, с помощью компьютерного моделирования выравнивания структуры 25 белка.

[0045] В настоящей заявке термин «вирус гепатита С», «HCV» или «HCV» включает различные вирусные генотипы, подтипы, квазивиды и изоляты. Он включает любой нецитопатический РНК-вирус, который имеет одноцепочечный и положительно-цепочечный РНК-геном, принадлежащий к роду *Hepacivirus* 30 семейства *Flaviviridae*. Термин включает различные изоляты HCV, такие как, без ограничения, те, которые имеют последовательности полипротеина и номера доступа, показанные выше, а также любые другие из базы данных NCBI. Примеры различных генотипов, охватываемых этим термином, включают, без

ограничения, генотипы 1, 2, 3, 4, 5 и 6, как описано в Simmonds et al. (*Hepatology* 42:962-973, 2005). Ссылка на HCV также включает ссылки на любые дополнительные генотипы, которые установлены. Примеры различных подтипов включают, без ограничения, 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 2i, 2k, 3a, 3b, 3k, 4a, 4d, 4f, 5a, 6a, 5 6b, 6c, 6d, 6e, 6f, 6g, 6h, 6i, 6j, 6k, 6l, 6m, 6n, 6o, 6q, 6r и 6t. Термин также включает HCV клеточной культуры (HCVcc) и псевдотипированный HCV (HCVpp), а также квазивиды HCV. Различные HCV описаны в Simmonds P. in *Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on, J Gen Virol* 85:3173-3188 (2004) и Simmonds et al. in *Consensus proposals for a unified system of 10 nomenclature of hepatitis C virus genotypes, Hepatology* 42:962-973 (2005). Нуклеотидные последовательности HCV известны в данной области техники. Например, см. Исследовательский центр вирусной биоинформатики (hcvdb.org) и базу данных вирусов гепатита С (hcv.lanl.gov).

[0046] В данном контексте иммуноген представляет собой белок или его 15 часть, способные индуцировать иммунный ответ у млекопитающего, такого как млекопитающее, инфицированное или подверженное риску инфекции патогеном. Введение иммуногена может привести к защитному иммунитету и/или активному иммунитету против патогена, представляющего интерес.

[0047] Иммунный ответ относится к ответу клетки иммунной системы, такой 20 как В-клетка, Т-клетка или моноцит, на стимул. Согласно некоторому варианту реализации ответ является специфичным в отношении конкретного антигена («антиген-специфичный ответ»). Согласно некоторым вариантам реализации иммунный ответ представляет собой Т-клеточный ответ, такой как ответ CD4+ клеток или ответ CD8+ клеток. Согласно некоторым другим вариантам 25 реализации ответ представляет собой В-клеточный ответ и приводит к наработке специфичных антител.

[0048] Иммуногенная композиция относится к композиции, содержащей 30 иммуногенный полипептид, который вызывает измеримый CTL-ответ против вируса, экспрессирующего указанный иммуногенный полипептид, или вызывает измеримый В-клеточный ответ (такой как продукция антител) против указанного иммуногенного полипептида.

[0049] Идентичность последовательности или сходство между двумя или более последовательностями нуклеиновых кислот или двумя или более

аминокислотными последовательностями выражается в значениях идентичности или сходства между последовательностями. Идентичность последовательности можно измерить в значениях процентной идентичности, где более высокий процент указывает на большую степень идентичности последовательностей. Две последовательности являются «по существу идентичными», если указанные две последовательности имеют конкретный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т.е. идентичность на 60%, необязательно, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% по точно указанному участку или целой последовательности при отсутствии точно указанного участка) при сравнении и выравнивании для максимального соответствия по окну сравнения или обозначенной области, как измерено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем выравнивания вручную и визуальной оценки. Необязательно, идентичность представляет собой идентичность по области, которая составляет по меньшей мере приблизительно 50 нуклеотидов (или 10 аминокислот) в длину или, более предпочтительно, по области, которая составляет от 100 до 500 или 1000 или более нуклеотидов (или 20, 50, 200 или более аминокислот) в длину.

[0050] Гомологи и ортологи последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей обладают относительно высокой степенью идентичности последовательности/сходства при выравнивании с использованием стандартных способов. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Различные программы и алгоритмы выравнивания описаны в источниках: Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, *Gene*, 73:237-44, 1988; Higgins & Sharp, *CABIOS* 5:151-3, 1989; Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90, 1988; Huang et al. *Computer Appls. in the Biosciences* 8, 155-65, 1992; и Pearson et al., *Meth. Mol. Bio.* 24:307-31, 1994. Источник Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990, предоставляет подробное рассмотрение методов выравнивания последовательностей и расчетов гомологии.

[0051] Термин «субъект» относится к любому животному, классифицированному как млекопитающее, например, человеку и не

представляющему собой человека млекопитающему. Примеры отличных от человека животных включают собак, кошек, крупный рогатый скот, лошадей, овец, свиней, коз, кроликов и т.д. Если не указано обратное, термины «пациент» или «субъект» используются в настоящей заявке взаимозаменяемо.

5 Предпочтительно, субъект представляет собой человека.

[0052] Термин «лечение» или «ослабление» включает введение соединений или агентов субъекту для предотвращения или задержки начала проявления симптомов, осложнений или биохимических показателей заболевания (например, инфекции, вызванной HCV), ослабления симптомов или сдерживания или
10 подавления дополнительного развития заболевания, состояния или расстройства. Субъекты, нуждающиеся в лечении, включают субъектов, которые уже страдают заболеванием или расстройством, а также субъектов, которые имеют риск развития указанного расстройства. Лечение может являться профилактическим (для предотвращения или отсрочивания манифестации заболевания или для
15 предотвращения проявления его клинических или субклинических симптомов) либо терапевтическим подавлением или облегчением симптомов после проявления заболевания.

[0053] Вакцина означает фармацевтическую композицию, которая вызывает профилактический или терапевтический иммунный ответ у субъекта. В
20 некоторых случаях иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ. Как правило, вакцина вызывает антиген-специфичный иммунный ответ на антиген патогена, например, вирусного патогена, или на компонент клетки, связанный с патологическим состоянием. Вакцина может содержать
25 полинуклеотид (такой как нуклеиновая кислота, кодирующая описанный антиген), пептид или полипептид (такой как описанный антиген), вирус, клетку или один или более клеточных компонентов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, вакцины или иммуногены вакцины или композиции вакцины экспрессируются из слитых конструкций и подвергаются
30 самосборке в наночастицы, экспонирующие иммуногенный полипептид или белок на поверхности.

[0054] Вирусоподобная частица (virus-like particle, VLP) относится к нереплицирующейся вирусной оболочке, происходящей из любого из нескольких вирусов. VLP обычно состоят из одного или нескольких вирусных белков, таких

как, без ограничения, такие белки, обозначаемые белки капсида, покрытия, оболочки, поверхности и/или оболочечные белки, или образующие частицы полипептиды, полученные из данных белков. VLP могут образовываться спонтанно после рекомбинантной экспрессии белка в соответствующей системе экспрессии. Способы получения конкретных VLP известны в данной области техники. Присутствие VLP после рекомбинантной экспрессии вирусных белков можно обнаружить с применением общепринятых методик, известных в данной области техники, например, посредством электронной микроскопии, биофизической характеристики и т.п. См., например, публикации Baker et al. (1991) *Biophys. J.* 60:1445-1456; и Hagensee et al. (1994) *J. Virol.* 68:4503-4505. Например, VLP можно выделить посредством центрифугирования в градиенте плотности и/или идентифицировать посредством характерных полос плотности. Альтернативно, можно осуществлять криоэлектронную микроскопию на витрифицированных образцах интересующих препаратов VLP в водных растворах и получать изображения при подходящих условиях экспозиции.

[0055] Самособирающаяся наночастица относится к белковой оболочке шаровидной формы с диаметром, составляющим десятки нанометров, и хорошо определенной поверхностной геометрией, которая формируется идентичными копиями невирусного белка, способного автономно собираться в наночастицу, имеющую сходный с VLP вид. Известные примеры включают ферритин (FR), который является консервативным среди разных видов и формирует 24-мер, а также дигидролипоилацилтрансферазу *B. stearothermophilus* (E2p), люмазинсинтазу *Aquifex aeolicus* (LS) и энкапсулин *Thermotoga maritima*, все из которых образуют 60-меры. Самособирающиеся наночастицы могут образовываться спонтанно при рекомбинантной экспрессии белка в подходящей системе экспрессии. Способы получения, выявления и характеристики наночастиц можно осуществлять с использованием таких же методов, как методы, разработанные для VLP.

30 III. Иммуногенные полипептиды кора E2 HCV с измененным дизайном

[0056] Настоящее изобретение относится к сконструированным или имеющим измененный дизайн полипептидам кора E2 или белкам HCV для получения вакцин против HCV. E2 представляет собой трансмембранный белок I

типа с аминоконцевым эктодоменом, соединенным с карбокси-концевой трансмембранной спиралью через амфипатический, α -спиральный стебель. Полипептид E2 расположен в полипротеине HCV непосредственно после полипептида E1 в аминокислотных остатках, соответствующих остаткам 384-746

5 изолята H77 генотипа 1a HCV. См., например, Goffard et al., *Biochimie* 85, 295-301, 2003. E2 является высокомодифицированным посттрансляционно с несколькими (9-11) N-связанными сайтами гликозилирования и 20 остатками цистеина, которые являются консервативными для всех генотипов. Если иное не

10 указано, в настоящей заявке в качестве эталона используется нумерация аминокислотных остатков изолята H77 HCV генотипа 1a.

[0057] Кор E2 относится к части E2, которая образует трехмерную структуру, которая распознается широко нейтрализующим антителом, AR3C Fab. См., например, Law et al., *Nat. Med.* 2008;14:25, 2008. Кор E2 имеет компактную глобулярную доменную структуру, состоящую в основном из β -цепей и

15 случайной спирали с двумя небольшими α -спиралями. Нити расположены в двух перпендикулярных листах (A и B), которые удерживаются вместе обширным гидрофобным кором и дисульфидными связями. Кор E2 содержит центральный иммуноглобулино(Ig)-подобный β -сэндвич с передним и задним слоями. В

20 настоящей заявке полипептид кора E2 относится к сконструированной полипептидной последовательности, которая включает остатки или фрагменты E2, которые соответствуют ключевым структурным элементам кора E2 в его трехмерной структуре E2. Прототип полипептида кора E2, E2c (SEQ ID NO:3), получен из E2 Δ TM изолята H77. Он состоит из аминокислот 412-459 E2, линкера GSSG, заменяющего остатки 460-485 E2, и аминокислот 486-645, причем обе

25 стеблевые области и трансмембранная (TM) область удалены. По сравнению с последовательностью E2, E2c дополнительно содержит мутации N448D и N576D. Дополнительный модифицированный полипептид кора E2, E2c3 (SEQ ID NO:4), получен из E2c. По сравнению с E2c, полипептид E2c3 дополнительно содержит линкер "GGPTDG" (SEQ ID NO:43), заменяющий остатки E2 569-597. Таким

30 образом, он состоит из аминокислот 412-459, линкера «GSSG», аминокислот 486-568, линкера «GGPTDG» (SEQ ID NO:43) и аминокислот 598-645. Кроме того, E2c3 несет только замену N448D, причем замена N576D удалена в результате замены остатков 569-597 линкером GGPTDG (SEQ ID NO:43). См., например,

Kong et al., *Science*. 342:1090–1094, 2013; и Kong et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 12768–12773, 2016.

[0058] Если не указано иное, нумерация аминокислотных остатков E2 или его производного (например, E2ΔTM и кора E2), а также различных модифицированных полипептидов кора HCV согласно настоящему изобретению основана на изоляте H77 генотипа 1a HCV. Благодаря существенному сохранению последовательности среди белков E2 из различных генотипов HCV, соответствующие аминокислотные остатки, граничащие с различными доменами, областями и петлями белка E2 из любого другого генотипа и изолята HCV, могут быть легко определены (например, путем выравнивания последовательностей) или иным образом известны в данной области техники. Например, в то время как кор E2 изолята H77 охватывает остатки 412-645, кор E2 генотипа 2a HCV, изолят J6 состоит из остатков, охватывающих 412-645 на основе системы нумерации H77 (или 412–649 в фактической последовательности полипептида J6). См., например, Kong et al., *Science*. 342:1090–1094, 2013; и Khan et al., *Nature* 509:381-384, 2014.

[0059] В целом, модифицированные полипептиды HCV E2 согласно настоящему изобретению содержат одну или более модификаций в области VR2 с нарушением порядка и β-сэндвич петле. Исходная область VR2 с нарушением порядка содержит 43 остатка, соответствующие остаткам 452-494 в изоляте H77, CPERLASCRRRLTDFAGQGWGPISYANGSGLDERPYCWHYPPRPC (SEQ ID NO:5). Соответствующая область в сконструированных белках E2с, известных в данной области техники, E2с и E2с3, содержит последовательность из 21 остатка, CPERLASCSSGCWHYPPRPC (SEQ ID NO:6). Как правило, модифицированные полипептиды E2 HCV согласно настоящему изобретению содержат дополнительную укороченную область VR2 с нарушением порядка (tVR2) по сравнению с модифицированными белками E2с, известными в данной области техники, E2с и E2с3. Согласно различным вариантам реализации дополнительно укороченная область VR2 с нарушением порядка («tVR2») в модифицированных полипептидах E2 HCV содержит менее приблизительно 20, 19, 18, 17, 16 или менее остатков. Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации изобретения, tVR2 содержит менее приблизительно 15, 14, 13, 12 или менее остатков. Как показано в приведенной в качестве примера последовательности tVR2 полипептида E2 HCV с измененным дизайном E2мс3,

CPERASGHYPRPC (SEQ ID NO:10), дальнейшее укорочение области VR2 с нарушением порядка E2c и E2c3 включает делеции различных остатков в SEQ ID NO:6. Согласно некоторым вариантам реализации tVR2 полипептидов E2 HCV с нарушением порядка согласно настоящему изобретению может иметь

5 аминокислотную последовательность, представленную в C(X)_nHYPRPC (SEQ ID NO:7), где X представляет собой любой аминокислотный остаток, и n составляет от приблизительно 3 до приблизительно 10. Согласно некоторым из данных вариантов реализации tVR2 содержит 13 или 12 остатков согласно CXXXXXXHYPRPC (SEQ ID NO:8) или CXXXXXXHYPRPC (SEQ ID NO:9), где X

10 представляет собой любой аминокислотный остаток. Важно отметить, что полипептид E2 предшествующего уровня техники, такой как E2c3, не может быть экспонирован на наночастицах со значимой экспрессией. Напротив, дополнительная модификация области VR2 с нарушением порядка в полипептидах E2 HCV с измененным дизайном согласно настоящему

15 изобретению обеспечивает удовлетворительное экспонирование полипептидов на наночастицах, как приведено в пример в настоящей заявке.

[0060] Помимо укороченной длины, модификация области VR2 с нарушением порядка может дополнительно включать оптимизацию последовательности для дальнейшей стабилизации полипептидов E2 HCV.

20 Оптимизация последовательности tVR2 может быть осуществлена с использованием конструкции белка de novo на основе ансамбля, как описано, например, в Kong et al., Nat. Commun. 7:12040, 2016. Конкретные рекомендации по оптимизации последовательности tVR2 путем выбора случайных последовательностей, выполнения смоделированного отжига и идентификации

25 последовательностей с наименьшей энергией также приведены в Примерах в настоящей заявке. В некоторых полипептидах E2 HCV с измененным дизайном согласно настоящему изобретению последовательность tVR2 получена в результате оптимизации последовательности согласно любой из SEQ ID NO:7-9. В качестве примера с полипептидами E2 HCV с измененным дизайном,

30 представленными в SEQ ID NO:27-38, оптимизированная последовательность tVR2 может представлять собой любую из SEQ ID NO:65-74, по существу идентичную последовательность или ее консервативно замещенный вариант.

[0061] В дополнение или в качестве альтернативы к модифицированной области VR2 с нарушением порядка, полипептиды E2 HCV с измененным дизайном согласно настоящему изобретению также содержат модификацию в β -сэндвич домене. Как показано на Фигуре 1А, β -сэндвич домен состоит из двух частей, остатков 485-518 и 536-569, в линейной последовательности HCV E2. Эти две части взаимодействуют друг с другом и образуют β -сэндвич домен в трехмерной структуре. Этот β сэндвич-домен состоит из 7 β -цепей, где связывающая петля CD81 (остатки 519-535) соединяет две части домена между β -цепочкой 5 и 6. Модификация β -сэндвич домена в полипептидах E2 HCV с измененным дизайном согласно настоящему изобретению относится к β -сэндвич петле, остаткам 540-550 изолята H77 (NNTRPPLGNWF; SEQ ID NO:21), которая соединяет β -цепочку 6-7 в β -сэндвич домене. Эта модификация предназначена для разрушения сайта связывания на E2, который распознается не нейтрализующими антителами, тем самым фокусируя иммунный ответ на нейтрализующие антитела широкого спектра действия. Модификация включает делецию одного или более остатков в последовательности β -сэндвич петли, которые образуют кончик в 3-D структуре. В изоляте H77 они представляют собой остатки 543-546 (RPPL; SEQ ID NO:22). Необязательно, один или более смежных остатков также могут быть удалены. Таким образом, в различных вариантах реализации модификация β -сэндвич петли может повлечь за собой делецию любой комбинации 1, 2, 3, 4, 5 или 6 остатков из остатков 542-547 (TRPPLG; SEQ ID NO:23). Согласно некоторым вариантам реализации модификация β -сэндвич петли включает делецию остатков PP, RPP, PPL, RPPL (SEQ ID NO:22), TRPPL (SEQ ID NO:24), RPPLG (SEQ ID NO:25) или TRPPLG (SEQ ID NO:23). Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации указанная модификация включает делецию остатков RPPL (SEQ ID NO:22) из β -сэндвич-петли.

[0062] Предпочтительно, полипептиды кора E2 HCV с измененным дизайном содержат как модификации области VR2 с нарушением порядка, так и β -сэндвич петли, как описано выше. Некоторые конкретные примеры полипептидов кора E2 HCV с измененным дизайном, содержащих такие модификации, представлены в SEQ ID NO:26-38. Как приведено в пример в настоящей заявке, хотя они получены из различных изолятов и генотипов HCV, все эти полипептиды кора E2

НСV с измененным дизайном продемонстрировали по существу улучшенный выход и чистоту, а также удовлетворительную иммуногенность. Помимо указанных специфичных полипептидов, модифицированные полипептиды НCV E2 согласно настоящему изобретению также охватывают полипептиды, имеющие

5 аминокислотную последовательность, которая по существу идентична одной из указанных последовательностей, включая консервативно модифицированные вариантные последовательности. Согласно различным вариантам реализации изобретения, полипептиды кора E2 НCV с измененным дизайном согласно настоящему изобретению могут иметь аминокислотную последовательность,

10 идентичную любой из SEQ ID NO:26-38, за исключением одной или более замен аминокислотных остатков неконсервативных остатков среди различных изолятов или генотипов НCV, или замен в неконсервативной области или мотиве последовательности E2 различных изолятов или генотипов НCV.

[0063] Как приведено в пример в настоящей заявке, с помощью изолята H77

15 (генотип 1a) и изолята НК6a (генотип 6a), последовательности E2 из различных штаммов НCV можно легко использовать для получения полипептидов иммуногена НCV в соответствии со стратегией изменения дизайна, описанной в данной заявке. Изоляты НCV были сгруппированы в семь генотипов и ряд подтипов, которые имеют различное географическое распределение.

20 Последовательности E2 многих из этих изолятов уже известны. Например, информация о последовательности, связанной с НCV, может быть получена из баз данных вирусов гепатита С, поддерживаемых Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний (NIAID). Хотя между последовательностями E2 различных изолятов НCV существует значительная

25 степень вариабельности, в последовательностях E2 было идентифицировано определенное количество консервативных мотивов или нейтрализующих эпитопов. При изменении дизайна полипептидов кора E2 с заданной последовательностью E2 НCV в соответствии со стратегией, описанной в настоящей заявке, можно легко определить соответствующие остатки для

30 модификаций посредством выравнивания последовательностей, а также с учетом консервативных мотивов, известных в данной области техники. См., например, Simmonds et al., *Hepatology* 42:962-973, 2005; Wang et al., *Viruses* 3:2127-2145, 2011; и Krey et al., *PLoS Pathog.* 6:e1000762, 2010; Bhattarai et al., *PLoS Pathog.* 11:

e1005183, 2015; и Kachko et al., *Vaccine* 30:69–77, 2011. Как приведено в примерах в настоящей заявке с помощью изолята НКба, полипептиды E2 HCV с измененным дизайном из других изолятов могут быть получены путем прямого принятия конструкций последовательностей H77 без дополнительной

5 модификации. Это включает замену области VR2 с нарушением порядка такой же оптимизированной последовательностью tVR2, идентифицированной для изолята H77, и удаление соответствующих остатков в кончике β -сэндвич петли, как в модифицированных последовательностях H77, приведенных в качестве примера в настоящей заявке.

10 **[0064]** Как подробно описано ниже, модифицированные полипептиды E2 HCV можно конъюгировать с презентующей платформой (например, наночастицами или VLP) посредством различных способов. Предпочтительно, конъюгацию обеспечивают посредством ковалентной связи, например, слияний или вставок белка. Согласно некоторым предпочтительным вариантам

15 реализации последовательность белка слита с последовательностью презентующей платформы посредством последовательности линкера. В различных вариантах реализации также можно ввести другие модификации в полипептиды E2 с измененным дизайном или в партнер конъюгации с целью улучшения стабильности или антигенности.

20 **[0065]** Различные полипептиды HCV E2 с измененным дизайном, применяемые в настоящем изобретении, можно получить посредством протоколов или образовать в соответствии с протоколами, примеры которых приведены в настоящей заявке, или с помощью способов, хорошо известных в данной области техники. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A*

25 *Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y., (3rd ed., 2000); и Brent et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (ringbou ed., 2003). После рекомбинантной экспрессии (например, в клетках HEK293 F, как подробно описано в настоящей заявке) белки можно очистить посредством любой из общепринято применяемых на практике процедур. См., например, *Guide to*

30 *Protein Purification*, Ed. Deutscher, Meth. Enzymol. 185, Academic Press, San Diego, 1990; и Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer Verlag, New York, 1982. Очистка по существу обозначает очистку от других белков или компонентов клетки. По существу очищенный белок является по меньшей мере

на 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 98% чистым. После очистки антигенность и другие свойства полипептидов HCV E2 с измененным дизайном можно также с легкостью изучить с применением стандартных способов, например, антигенного профилирования с применением известных bNAbs и антител, отличных от NAb, дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), электронной микроскопии, анализа связывания посредством ELISA, биослойной интерферометрии (БСИ), поверхностного плазмонного резонанса (SPR), а также анализа методом сокристаллографии в соответствии с примерами настоящей заявки.

10

IV. Композиции E2 HCV скаффолд-вакцины

[0066] Помимо сконструированных или полипептидов E2 HCV с измененным дизайном, описанных выше, в настоящем изобретении также предложены композиции вакцины на основе полипептида E2 против HCV, которые содержат гетерологичный скаффолд, презентирующий или содержащий модифицированный белок E2 HCV. Любой гетерологичный скаффолд можно использовать для презентирования полипептида E2 HCV с измененным дизайном при конструировании вакцин согласно настоящему изобретению. Они включают наночастицы, вирусоподобные частицы, носители белка (например, цепи или домены иммуноглобулина, такие как Fc, KLH, BSA, столбнячный анатоксин и дифтерийный анатоксин), а также различные химические скаффолды. В некоторых вариантах реализации можно применять вирусоподобную частицу (VLP), такую как β VLP на основе бактериофага Q и наночастицы. Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации гетерологичный скаффолд для презентирования или экспонирования полипептида E2 HCV с измененным дизайном представляет собой самособирающуюся наночастицу. При получении композиций вакцины согласно настоящему изобретению можно применять различные платформы наночастиц. В целом, для образования наночастиц, используемых согласно настоящему изобретению, требуется множество копий одной субъединицы. Наночастицы, как правило, имеют шарообразную структуру и/или имеют осевую симметрию (например, с оси 3-го и 5-го порядка), например, с икосаэдрической структурой, приведенной в пример в настоящей заявке. Дополнительно или в качестве альтернативы, амино-конец субъединицы частицы

20

25

30

должен быть экспонирован и должен находиться в непосредственной близости от оси симметрии третьего порядка, и расстояние между тремя аминоконцами должно точно соответствовать расстоянию между карбокси-концами полипептидов E2 HCV. Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации изобретения, иммуногены состоят из самособирающихся наночастиц с диаметром, составляющим приблизительно 20 нм или менее (как правило, собираемых из 12, 24 или 60 субъединиц), и осями 3 порядка на поверхности частицы.

[0067] Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации иммуногенный белок или полипептид (например, белок E2 HCV) презентуется на самособирающихся наночастицах, таких как самособирающиеся наночастицы, полученные на основе E2p, I3-01 и ферритина (FR), как приведено в пример в настоящей заявке. E2p представляет собой переконструированный вариант дигидролипоилацилтрансферазы из бактерий *Bacillus stearothermophilus*, который, как было показано, подвергается самосборке в термостабильные 60-мерные наночастицы. См., например, He et al., *Nat. Commun.* 7:12041, 2016. Подобным образом, I3-01 представляет собой сконструированный белок, который может подвергаться самосборке в гиперстабильные наночастицы. См., например, Hsia et al., *Nature* 535, 136-139, 2016. Последовательности субъединиц указанных белков известны в данной области техники. См., например, WO2017/192434. Ферритин представляет собой глобулярный белок, обнаруженный у всех животных, бактерий и растений. Глобулярная форма ферритина образована из мономерных субъединичных белков (также обозначаемых «мономерные субъединицы ферритина»), которые представляют собой полипептиды молекулярной массой приблизительно 17 – 20 кДа. Аминокислотные последовательности субъединиц E2p, I3-01 и ферритина, приведенных в пример в настоящей заявке, показаны в SEQ ID NO:39-41, соответственно. По сравнению с исходной последовательностью последовательность E2p, показанная в SEQ ID NO:39, содержит замену на Ala остатка 92, подчеркнутую в приведенной ниже последовательности. Согласно различным вариантам реализации изобретения, в вакцинах против HCV на основе наночастиц с E2 согласно настоящему изобретению могут использоваться любые из известных наночастиц, а также их консервативно модифицированные варианты или варианты, имеющие по

существованию идентичные последовательности (например, идентичные по меньшей мере на 90%, 95% или 99%).

[0068] Последовательность субъединицы E2p (SEQ ID NO:39)

5 AAAPATTEGEFPETREKMSGIRRAIAKAMVHSHHTAPHVTLMDVTKLV
AHRKKFKAIAAEKGIKLTFLPYVVKALVSALREYVLTNTAIDDETEEIIQKHYY
NIGIAADTDRGLLVPVIKHADRKPIFALAEINELAEKARDGKLTGEMKGGASC
TITNIGSAGGQWFTPVINHPEVAILGIGRIAEKPIVRDGEIVAAPMLALSLSFDHR
MIDGATAQKALNHIKRLLSDPPELLLM

10 **[0069]** Последовательность субъединицы I3-01 (SEQ ID NO:40)

MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKALAVFLGGVHLEITFTVPDADTVIK
ELSFLKEMGAIGAGTVTSVEQCRKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFCKEKGVFYM
PGVMTPTTELVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKVVPTGGVN
LDNVCEWFKAGVLA VGVGSALVKGTPVEVAEKAKAFVEKIRGCTE

15

[0070] Последовательность ферритина (SEQ ID NO:41)

MLSKDIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYE
HAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPENKFEGLTQIFQKAYENEQHISESINNIVDHA
KSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIA
20 KSRKS

[0071] Помимо указанных приведенных в пример последовательностей

наночастиц при практическом осуществлении настоящего изобретения также могут использоваться многие другие наночастицы или VLP, известные в данной

25 области техники. Указанные наночастицы или VLP включают, например, люмазинсинтазу *Aquifex aeolicus*, энкапсулин *Thermotoga Maritima*, энкапсулин *Mухосoccus xanthus*, вирусную частицу бактериофага Qbeta, частицу вируса Flock House (FHV), частицу вируса ORSAY и частицу вируса инфекционного бурсита (IBDV). Другие молекулы, которые могут быть использованы в качестве

30 презентующей платформы вакцин на основе наночастиц согласно настоящему изобретению, включают, например, молекулы со следующими

идентификационными номерами базы данных белковых структур PDB: 1JIG (12-мерный Dlp-2 из *Bacillus anthracis*), 1UVH (12-мерный DPS из *Mycobacterium smegmatis*), 2YGD (24-мерный шаперон кристаллика глаза αB-кристаллин), 3CS0

35 (24-мерный DegP24), 3MH6 и 3MH7 (24-мерные протеазы HtrA), 3PV2 (12-мерный гомолог HtrA DegQ ДТ), 4A8C (12-мерный DegQ из *E. coli.*), 4A9G (24-мерный DegQ из *E. coli.*), 4EVE (12-мерный HP-NAP из штамма YS29

Helicobacter pylori) и 4GQU (24-мерный HisB из *Mycobacterium tuberculosis*).

[0072] Некоторые композиции вакцины на основе наночастиц с E2 против HCV могут дополнительно содержать другие структурные компоненты, которые функционируют для дальнейшего повышения стабильности и антигенности экспонируемого иммуногена. Согласно некоторым вариантам реализации

5 сцепляющий белковый домен может быть вставлен в конструкцию наночастицы, например, путем ковалентного слияния с С-концом субъединицы наночастицы. Сцепляющий домен может представлять собой любой димерный белок, который способен образовывать область контакта через специфичные взаимодействия, такие как гидрофобные контакты (ван-дер-ваальсовы силы), водородные связи

10 и/или солевые мостики. Общие рекомендации по выбору сцепляющих доменов и конкретные примеры описаны в данной области техники, например, РСТ2019/036917. Согласно некоторым вариантам реализации вакцины против HCV на основе наночастиц с E2 согласно настоящему изобретению также содержат Т-клеточный эпитоп для обеспечения сильных Т-клеточных ответов и

15 для направления дифференцировки В-клеток, приводящей к продукции bNAb. Т-клеточный эпитоп может быть расположен в любом положении по отношению к другим структурным компонентам, при условии, что его расположение не влияет на презентирование иммуногенных полипептидов на поверхности наночастицы. Любые последовательности Т-клеточного эпитопа или пептидов, известных в

20 данной области техники, можно применять при практическом осуществлении настоящего изобретения. Они включают любую полипептидную последовательность, которая содержит эпитопы МНС II класса и может эффективно активировать CD4+ и CD8+ Т-клетки при иммунизации (например, Т-хелперный эпитоп, который активирует CD4+ Т-хелперные клетки). См.,

25 например, Alexander et al., *Immunity* 1, 751-761, 1994; Ahlers et al., *J. Clin. Invest.* 108:1677-1685, 2001; Fraser et al., *Vaccine* 32, 2896-2903, 2014; De Groot et al., *Immunol. Cell Biol.* 8:255-269, 2002; и *Gene Ther.* 21: 225-232, 2014. Согласно некоторым вариантам реализации вакцины на основе наночастиц с E2 против HCV согласно настоящему изобретению также содержат переходный участок или

30 домен для облегчения экспонирования иммуногена на поверхности наночастиц. Переходная область может представлять собой трехспиральный пучок, происходящий из вирусного белка, например, домена вируса Хендра (PDB ID: 4HEO) или домена вируса кори (PDB ID: 1OKS). Как правило, его встраивают

между иммуногеном и субъединицей наночастицы, обеспечивая таким образом
возвышение иммуногенного полипептида над поверхностью наночастицы.
Согласно некоторым вариантам реализации вакцины на основе наночастиц
согласно настоящему изобретению могут содержать белковый домен, который
5 служит для стабилизации иммуногенного полипептида. Например, белковый
домен может представлять собой С-концевой мотив тримеризации Т4 фибритина
(фолдон), который хорошо известен в данной области техники. Этот фолдон-
домен состоит из 30-ти С-концевых аминокислотных остатков тримерного белка
фибритина бактериофага Т4 и служит для обеспечения сворачивания и
10 тримеризации фибритина. См., например, Papanikolopoulou et al., J. Biol. Chem.
279: 8991-8998, 2004; и Guthe et al., J. Mol. Biol. 337: 905-915, 2004.

[0073] Композиции E2 HCV скаффолд-вакцины согласно настоящему
изобретению могут быть сконструированы в соответствии со стандартными
рекомбинантными методами и способами, описанными в настоящей заявке
15 (например, Примеры 4 и 8) и/или другими способами, которые были описаны в
данной области техники, например, He et al., Nat. Comm. 7, 12041, 2016; Kong et
al., Nat. Comm. 7, 12040, 2016; и He et al., Sci Adv. 4(11):eaau6769, 2018. Согласно
различным вариантам реализации наночастицу, экспонирующую любой из
полипептидов E2 HCV с измененным дизайном, можно сконструировать путем
20 слияния полипептида E2 с субъединицей наночастицы (например, субъединицей
E2p). Предпочтительно, С-конец полипептида E2 HCV слит с N-концом
субъединицы наночастицы. Согласно некоторым вариантам реализации короткий
связанный пептид может быть использован для соединения полипептида E2 и
наночастицы, например, линкера 10GS (GGGGSGGGGS) (SEQ ID NO:42),
25 приведенного в качестве примера в настоящей заявке. После конструирования
антигенность и структурную целостность полипептидов E2 HCV, экспонируемых
наночастицами, можно легко анализировать посредством стандартных анализов,
например, анализов связывания антител, биослойной интерферометрии и
электронной микроскопии (ЭМ) с негативным окрашиванием. Как приведено в
30 пример в настоящей заявке, различные слитые молекулы могут самособираются в
наночастицы, которые экспонируют иммуногенные эпитопы полипептидов E2
HCV. Благодаря индуцированию наработки устойчивого ответа посредством

нейтрализующих антител, данные наночастицы являются подходящими для вакцинации индивидуумов против широкого диапазона вирусов HCV.

V. Полинуклеотиды и экспрессионные конструкции

- 5 [0074] Полипептиды E2 HCV с измененным дизайном и композиции вакцины на основе наночастиц согласно настоящему изобретению, как правило, получают сначала путем создания экспрессионных конструкций (т.е. векторов экспрессии), которые содержат функционально связанные кодирующие последовательности различных структурных компонентов, описанных в настоящей заявке.
- 10 Соответственно, в некоторых связанных аспектах в настоящем изобретении предложены по существу очищенные полинуклеотиды (ДНК или РНК), которые кодируют модифицированные полипептиды E2 HCV и наночастицы, экспонирующие иммуногены E2 HCV, как описано в настоящей заявке, а также векторы экспрессии, которые содержат такие полинуклеотиды и клетки-хозяева
- 15 для продукции полипептидов E2 HCV и композиций вакцины (например, клетки HEK293 F и клетки ExpiCHO, приведенные в пример в настоящей заявке). Слитые полипептиды, кодируемые полинуклеотидами или экспрессируемые на основе векторов, также включены согласно настоящему изобретению.
- [0075] Полинуклеотиды и связанные векторы можно легко создавать с
- 20 помощью стандартных методов молекулярной биологии или протоколов, приведенных в пример в настоящей заявке. Например, общие протоколы для клонирования, трансфекции, временной генной экспрессии и получения стабильных трансфицированных клеточных линий описаны в данной области техники, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*,
- 25 Cold Spring Harbor Press, N.Y., (3rd ed., 2000); и Brent et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (ringbou edition, 2003). В последовательность полинуклеотида можно вводить мутации с помощью ПЦР, как описано, например, в источнике *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; *PCR*
- 30 *Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al., *Nucleic Acids Res.* 19:967, 1991; and Eckert et al., *PCR Methods and Applications* 1:17, 1991.

[0076] Выбор конкретного вектора зависит от предполагаемого применения слитых полипептидов. Например, выбранный вектор должен быть способен запускать экспрессию слитого полипептида в желаемом типе клеток, которые могут быть прокариотическими или эукариотическими. Многие векторы содержат последовательности, позволяющие как репликацию вектора в прокариотических клетках, так и экспрессию в эукариотических клетках функционально связанных последовательностей генов. Векторы, применимые согласно настоящему изобретению, могут представлять собой автономно реплицирующиеся векторы, т.е. указанный вектор является экстрахромосомным, и его репликация не обязательно непосредственно связана с репликацией генома клетки-хозяина. Альтернативно, репликация вектора может быть связана с репликацией хромосомной ДНК хозяина, например, вектор может быть встроен в хромосому клетки-хозяина, что достигается с помощью использования ретровирусных векторов и стабильно трансфицируемых клеточных линий.

15 Векторы на основе вирусов и невирусные векторы экспрессии можно использовать для получения иммуногенов в клетке-хозяине, представляющей собой клетку млекопитающего. Невирусные векторы и системы включают плазмиды, эписомальные векторы, как правило, с кассетой экспрессии для экспрессии белка или РНК, и искусственные хромосомы человека (см., например, 20 Harrington et al., *Nat. Genet.* 15:345, 1997). Применимые вирусные векторы включают векторы на основе лентивирусов или других ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, цитомегаловируса, вирусов герпеса, векторы на основе SV40, вируса папилломы, вируса Эпштейна-Барра НВР, векторы на основе вируса коровьей оспы и вируса леса Семлики (SFV). 25 См., Brent et al., *supra*; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49:807, 1995; и Rosenfeld et al., *Cell* 68:143, 1992.

[0077] В зависимости от конкретного вектора, используемого для экспрессии слитого полипептида, при практическом осуществлении изобретения могут применяться различные известные клетки или клеточные линии. Клетка-хозяин, которая может представлять собой любую клетку, в которую можно вводить рекомбинантные векторы, содержащие слитые полипептиды согласно настоящему изобретению, где указанный вектор может запускать экспрессию указанного слитого полипептида, применима согласно настоящему изобретению.

Клетка-хозяин может быть прокариотической, такой как любое количество бактериальных штаммов, или может быть эукариотической, такой как клетки дрожжей или другие клетки грибов, насекомых или амфибий или млекопитающих, включая, например, клетки грызунов, обезьян или человека.

5 Клетки, экспрессирующие слитые полипептиды согласно настоящему изобретению, могут представлять собой первичные клеточные культуры или установленную клеточную линию. Таким образом, помимо клеточных линий, приведенных в пример в настоящей заявке (например, клеток CHO), ряд других линий клеток-хозяев, хорошо известных в данной области техники, могут также
10 использоваться при практическом осуществлении настоящего изобретения. Такие клетки включают, например, различные клеточные линии Cos, клетки HeLa, HEK293, AtT20, BV2 и N18, миеломные клеточные линии, трансформированные В-клетки и гибридомы.

[0078] Применение культур клеток тканей млекопитающих для экспрессии
15 полипептидов обсуждается в целом, например, в источнике Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Векторы, экспрессирующие слитый полипептид, можно вводить в выбранные клетки-хозяева с помощью любого количества подходящих способов, известных специалисту в данной области техники. Для введения кодирующих слитый полипептид векторов в
20 клетки млекопитающих используемый метод будет зависеть от вида вектора. В случае плазмидных векторов ДНК, кодирующую последовательности слитого полипептида, можно вводить с помощью ряда методов трансфекции, включая, например, опосредованную липидами трансфекцию («липофекцию»), DEAE-декстран-опосредованную трансфекцию, электропорацию или преципитацию с
25 помощью фосфата кальция. Указанные способы подробно описаны, например, в источнике Brent et al., выше. Реагенты для липофекции и способы, подходящие для временной трансфекции широкого разнообразия трансформированных и нетрансформированных или первичных клеток являются широкодоступными, что делает липофекцию привлекательным способом введения конструкций в
30 эукариотические клетки и, в частности, клетки млекопитающих в культуре. Например, доступны наборы LipofectAMINE™ (Life Technologies) или LipoTachi™ (Stratagene). Другие компании, предлагающие реагенты и методы для липофекции включают Bio-Rad Laboratories, CLONTECH, Glen Research, Life Technologies,

JBL Scientific, MBI Fermentas, PanVera, Promega, Quantum Biotechnologies, Sigma-Aldrich и Wako Chemicals USA.

[0079] Для долговременной продукции рекомбинантных слитых полипептидов с высоким выходом стабильная экспрессия является предпочтительной. Вместо использования векторов экспрессии, которые содержат вирусные ориджины репликации, клетки-хозяева можно трансформировать кодирующими слитый полипептид последовательностями, которые контролируются подходящими контрольными элементами экспрессии (например, промоторными, энхансерными последовательностями, терминаторами транскрипции, сайтами полиаденилирования и т.д.) и селективируемыми маркерами. Селективируемый маркер в рекомбинантном векторе предоставляет устойчивость при селекции и позволяет стабильную интеграцию вектора в хромосомы клеток. Обычно используемые селективируемые маркеры включают neo, который предоставляет устойчивость к аминогликозиду G-418 (Colberre-Garapin, et al., J. Mol. Biol., 150:1, 1981); и hygro, который предоставляет устойчивость к гигромицину (Santerre et al., Gene, 30: 147, 1984). С помощью подходящих способов селекции можно получать трансфицированные клетки, содержащие встроенные копии кодирующей слитый полипептид последовательности.

20

VI. Фармацевтические композиции и способы терапевтического применения

[0080] В настоящем изобретении предложены фармацевтические или иммуногенные композиции и связанные способы применения полипептидов E2 HCV с измененным дизайном и наночастиц, экспонирующих полипептиды, как описано в настоящей заявке, для предотвращения и лечения инфекций, вызванных HCV. Согласно некоторым вариантам реализации в фармацевтическую композицию включен полипептид E2 HCV с измененным дизайном или наночастица, экспонирующая полипептид. Фармацевтическая композиция может представлять собой терапевтический состав или профилактический состав. Как правило, композиция дополнительно содержит один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей и, необязательно, других терапевтических компонентов (например, антибиотиков

30

или противовирусных лекарственных средств). В композиции также можно применять различные фармацевтически приемлемые добавки.

[0081] Некоторые фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению представляют собой вакцины. В случае композиций вакцины
5 можно дополнительно включать соответствующие адъюванты. Примеры подходящих адъювантов включают, например, гидроксид алюминия, лецитин, адъювант Фрейнда, MPL™ и IL-12. Согласно некоторым вариантам реализации полипептиды E2 HCV с измененным дизайном, раскрытые в настоящей заявке, могут быть приготовлены в виде состава с контролируемым высвобождением или
10 с замедленным высвобождением. Этого можно достичь в композиции, которая содержит полимер с медленным высвобождением, или с помощью микроинкапсулированной системы доставки или биоадгезивного геля. Различные фармацевтические композиции можно приготовить в соответствии со стандартными процедурами, хорошо известными в данной области техники. См.,
15 например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 19.sup.th Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1995; Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978); патенты США №№ 4,652,441 и 4,917,893; патенты США №№ 4,677,191 и 4,728,721; и патент США № 4,675,189.

[0082] Терапевтические способы согласно настоящему изобретению включают введение полипептида E2 HCV с измененным дизайном согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей полипептид, субъекту, имеющему или имеющему риск развития инфекции HCV. Согласно некоторым вариантам реализации фармацевтические композиции
20 согласно настоящему изобретению применяют для терапевтического или профилактического применения для лечения инфекции, вызванной HCV, или для вызова защитного иммунного ответа против HCV у субъекта. Например, композицию можно вводить субъекту для индукции иммунного ответа на HCV, например, для индукции наработки нейтрализующих антител против HCV
25 широкого спектра действия. В случае субъектов, подверженных риску развития HCV-инфекции, композицию вакцины согласно настоящему изобретению можно вводить для обеспечения профилактической защиты против вирусной инфекции. В зависимости от конкретного субъекта и состояний фармацевтические

композиции согласно настоящему изобретению можно вводить субъектам посредством множества способов введения, известных среднему специалисту в данной области техники, например, внутримышечным, подкожным, внутривенным, внутриартериальным, внутрисуставным, интраперитонеальным или парентеральным путями. В целом, фармацевтическую композицию вводят субъекту, который нуждается в таком лечении, в течение времени и при условиях, достаточных для предотвращения, ингибирования и/или облегчения выбранного заболевания или состояния либо одного или нескольких его симптомов. Симптомы воздействия или инфекции HCV включают, например, воспаление печени, снижение аппетита, усталость, боль в животе, желтуху, гриппоподобные симптомы, зуд, мышечную боль, боль в суставах, периодическую лихорадку с небольшим повышением температуры, нарушения сна, тошноту, диспепсию, когнитивные изменения, депрессию, головные боли и изменения настроения.

15 **[0083]** Как правило, иммуногенную композицию по настоящему изобретению вводят в количестве, достаточном для индукции иммунного ответа против HCV. Для терапевтического применения композиции должны содержать терапевтически эффективное количество полипептида E2 HCV с измененным дизайном или композиции вакцины на основе наночастиц, описанной в

20 настоящей заявке. Для профилактического применения композиции должны содержать профилактически эффективное количество полипептида E2 HCV или наночастиц, экспонирующих полипептид. Соответствующее количество полипептидного иммуногена или композиции на основе наночастиц можно определить в зависимости от конкретного заболевания или состояния, лечение

25 или предотвращение которого проводят, тяжести, возраста субъекта и других индивидуальных характеристик конкретного субъекта (например, общего состояния здоровья субъекта и надежности иммунной системы субъекта). Эффективные дозы дополнительно определяют на основе результатов исследований на животных моделях с последующими клиническими

30 испытаниями на человеке и регулируется протоколами введения, которые значительно снижают частоту возникновения или тяжесть симптомов заболеваний-мишеней или состояний-мишеней у субъекта.

[0084] Для вариантов профилактического применения иммуногенную композицию вводят до возникновения какого-либо симптома, например, до возникновения инфекции. Профилактическое введение иммуногенных композиций служит для предотвращения или облегчения любой последующей

5 инфекции. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации субъект, лечение которого проводят, представляет собой такового, который страдает от HCV-инфекции или который подвержен риску развития HCV-инфекции, например, в связи с воздействием или возможностью воздействия HCV. После введения терапевтически эффективного количества раскрытых терапевтических

10 композиций можно проводить мониторинг субъекта в отношении HCV-инфекции, симптомов, связанных с HCV-инфекцией, либо и того, и другого.

[0085] Для вариантов терапевтического применения иммуногенную композицию вводят во время или после манифестации симптома заболевания или

15 инфекции, например, после развития симптома HCV-инфекции или после постановки диагноза HCV-инфекции. Иммуногенную композицию можно, таким образом, вводить до ожидаемого воздействия вируса HCV для того, чтобы ослабить ожидаемую тяжесть, длительность или степень инфекции и/или связанные симптомы заболевания, после воздействия или предполагаемого воздействия вируса или после фактического начала инфекции.

[0086] Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно объединить с другими средствами, известными в данной области техники для лечения или предотвращения HCV-инфекций. Они включают, например, (1) даклатасвир, (2) элбасвир и grazoprevir, (3) глекапревир и пибрентасвир, (4)

25 ледипасвир и софосбувир, (5) омбитасвир, паритапревир и ритонавир, (6) симепревир (Olysio) и софосбувир (Sovaldi), (7) софосбувир и велпатасвир (Epclusa) и (8) софосбувир, велпатасвир и воксилапревир (Vosevi). См., например, Kish et al., P T. 42:316-329, 2017; и Dahiya et al., BCMJ 61:72-77, 2019. Введение фармацевтических композиций и известных агентов против HCV можно осуществлять одновременно или последовательно.

[0087] Фармацевтические композиции, содержащие полипептид E2 HCV с измененным дизайном или вакцину на основе наночастиц согласно настоящему изобретению, могут быть предложены в виде компонентов набора. Такой набор необязательно содержит дополнительные компоненты, включая упаковку,

инструкции и различные другие реактивы, такие как буферы, субстраты, антитела или лиганды, такие как контрольные антитела или лиганды, и реактивы для выявления. Необязательно в указанных наборах может быть дополнительно предложена инструкция по применению.

5

ПРИМЕРЫ

[0088] Следующие примеры предложены для иллюстрации, а не ограничения настоящего изобретения.

10 Пример 1 Структурная оптимизация кора гликопротеина E2 оболочки HCV

[0089] Эктодомен E2 HCV (E2 Δ TM или E2_{ECTO}) стабилизирован девятью консервативными дисульфидными связями, содержит три вариабельные области, включая гипервариабельную область 1 (HVR1, а. к. 384-410), VR2 (а. к. 460-485) и VR3 (а. к. 570-580), и покрыт ~11 N-связанными гликанами (см. Goffard et al.,
15 Biochimie 85, 295-301, 2003) (Фиг. 1A). HVR1 модулирует взаимодействие SR-BI и облегчает ускользание от иммунологического ответа хозяина путем генерации мутаций ускользания и экранирования нейтрализующих эпитопов. Эмпирическое конструирование (Фиг. 6A) позволило определить структуру E2 путем укорочения N-/C-концов и VR2, удаляя гликаны в N448 и N576 (см. Kong et al.,
20 Science 342, 1090-1094, 2013) и дополнительного усечения V3 (см., Tzarum et al., Sci Adv 5, eaav1882, 2019). Кор E2 содержит центральный иммуноглобулино(Ig)-подобный β -сэндвич с передним и задним слоями (Фиг. 6B). Сайт связывания рецептора CD81 представляет собой гидрофобный участок, образованный передним слоем и связывающей петлей CD81 и перекрывающий
25 нейтрализующую поверхность E2 (Фиг. 6B, середина). Однако современные конструкции E2c по-прежнему демонстрируют высокую гибкость, включающую C-концевой участок переднего слоя, укороченный VR2 и N-концевой участок β -сэндвича.

[0090] В данной заявке авторы настоящего изобретения изменили дизайн
30 области VR2 с нарушением порядка, которая заякорена к заднему слою и β -сэндвичу двумя дисульфидными связями, C452-C620 и C494-C564 (Фиг. 1, A и B). Хотя эта область состоит из 43 остатков в E2 дикого типа и 21 остатка в E2c/E2c3, расстояние Ca между C452 и C494 составляет 26,3Å для H77 E2c (Фиг.

6B), что может охватываться только 7 остатками. Сначала авторы осуществили
усечение петли VR2 вручную до 13 остатков (tVR2) (Фиг. 1, А и В; Фиг. 6А) и
удалили кончик (а. к. 543-546) β -сэндвич петли (а. к. 540-550), чтобы
сфокусировать иммунный ответ на эпитопы bNAb, такие как не-Nab, такие как
5 AR1B, E1 и НЕРС46, связывающиеся с этой областью (Фиг. 6, С-Е). Новый кор
E2 называется мини-кор E2 3 (E2mc3). Далее, авторы изменили дизайн tVR2 в
H77 E2mc3 для двух длин петли, 13 а. к. (как в E2mc3) и 12 а. к., используя
дизайн белка *de novo* на основе ансамбля (см. Kong et al., Nat. Commun. 7, 12040,
2016) для идентификации оптимальных последовательностей tVR2, которые
10 стабилизируют E2mc3 (Фиг. 1В). Для каждой длины tVR2 (13 и 12 а. к.) был
получен ансамбль (1000) конформаций петли для соединения С452 и С494 (Фиг.
6F) со среднеквадратичной флуктуацией $C\alpha$ (RMSF) в диапазоне от 1,9 до 9,8 Å
(среднее значение 3,6 Å) и от 1,6 до 7,8 Å (среднее значение 3,2 Å),
соответственно (Фиг. 6G). После обширного отбора образцов по методу Монте-
15 Карло для дальнейшей характеристики были отобраны пять последовательностей
с наилучшими показателями для каждой длины петли, E2mc3-v1-v5 и v6-v10
(Фиг. 1В, справа; Фиг. 6H). Поскольку НК6а E2c3 и H77 E2c имеют высокое
структурное сходство и неупорядоченные области при связывании с AR3 bNAb,
авторы изобретения разработали конструкции НК6а E2mc3 и E2mc3-v1 (Фиг. 6I)
20 без дополнительной модификации. В общей сложности одиннадцать коров E2
H77 и два кора E2 НК6а были переданы для экспериментальной оценки.

Пример 2 Биохимическая, биофизическая и антигенная оценка конструкций E2mc3 HCV

25 [0091] 13 конструкций E2mc3 из H77 и НК6а и двух родительских
конструкций E2c3 (см. Tzarum et al., Sci Adv 5, eaav1882, 2019; и Kong et al., Proc.
Natl. Acad. Sci. U.S.A. 113, 12768–12773, 2016) временно экспрессировали в
клетках HEK293 F и очищали с использованием иммуноаффинности (см. Kong et
al., Science 342, 1090-1094, 2013) с последующей эксклюзионной хроматографией
30 (SEC). В целом, очищенные варианты E2mc3 показали более высокий выход, чем
их соответствующие конструкции E2c3, в диапазоне от 5,0 до 11,5 мг при
трансфекции из 1 л 293F. AR3A-очищенный E2mc3 был в основном в
мономерной форме с небольшим пиком агрегата (Фиг. 1С и Фиг. 7А), и SEC-

очищенные белки прошли как одна полоса (~50 кДа) на SDS-PAGE (Фиг. 1D и Фиг. 7B). Затем авторы исследовали варианты Н77 и НК6а E2mc3 с помощью ELISA на панели антител против HCV, которая включает (b)NAb, нацеленные на антигенный сайт 412 (AS412), AS434, антигенную область 3 (AR3), AR2 и не-
5 NAb, нацеленные на AR1 (Фиг. 7C). Н77 E2mc3 продемонстрировал более высокое связывание, чем E2c3 для большинства bNAb (за исключением HEPC3/74) и NAb AR2A, с дополнительными улучшениями для некоторых вариантов E2mc3 (Фиг. 1E, верхняя панель; Фиг. 7, D и E). Как и ожидалось, усечение β -сэндвич петли снижало связывание с не-NAb AR1B и E1 с
10 незначительным эффектом на AR1A, который распознает AR1, но не β -сэндвич петлю. Аналогичные паттерны наблюдались для НК6а E2mc3 и E2mc3-v1, за исключением 212.1.1 (Фиг. 1E, нижняя панель; Фиг. 7, F и G) без обнаруживаемого связывания с помощью генотип-специфичных AR2A и AR1A/B. При биослойной интерферометрии (БСИ) варианты НК6а E2mc3
15 демонстрировали сходные антигенные профили (Фиг. 1F; Фиг. 7, H-J). Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) показала увеличение T_m на 4,2°C для E2mc3 (Н77) по сравнению с E2c3, которое было дополнительно увеличено на 1°C и 0,2°C для E2mc3-v1 и v6, соответственно (Фиг. 1G и Фиг. 7K).

20 Пример 3 Характеристика минимизированных коров, полученных из Н77 и НК6а

[0092] Кристаллизация коров E2 Н77 и НК6а с Fab из bNAb AR3A/B/C/D приводила к образованию структур Н77 E2mc3-v1 и E2mc3-v6 с AR3C и НК6а E2mc3-v1 с AR3B при 1,90 Å, 2,85 Å и 2,06 Å, соответственно (Фиг. 2). Общая
25 укладка вариантов E2mc3 очень похожа на Н77 E2c и НК6а E2c3 (PDB: 4MWF и 6VKV) (Фиг. 8A), но с различиями в С-конце заднего слоя (а. к. 629-640) и петле переднего слоя (а. к. 430-438) (Фиг. 8A), которая взаимодействует с HCDR3 bNAb AR3A-D. Однако аналогичные (гидрофильные) контакты поддерживаются с HCDR3 (Фиг. 8A), дополнительно поддерживая конформационную пластичность
30 переднего слоя E2. Укороченная β -сэндвич петля может быть полностью смоделирована в комплексе Н77 E2mc3-v1 с bNAb AR3C (Фиг. 8B), подтверждая, что ее усечение приводит к потере ключевых взаимодействий с не-NAb E1 (Фиг. 1E и Фиг. 2B). tVR2 с измененным дизайном может быть полностью

смоделирован в bNAб-связанных структурах H77 и НК6а E2mc3-v1, но виден только частично в AR3С-связанной структуре H77 E2mc3-v6 (Фиг. 2С и Фиг. 9А). Изменение дизайна tVR2 не вносит никаких конформационных изменений в нейтрализующую поверхность E2 (Фиг. 2D), которая заякорена к заднему слою и β-сэндвичу с помощью С452-С620 и С494-С564 и взаимодействует с усеченными VR3 и β-сэндвичем (Фиг. 9В). В то время как конструкции H77 и НК6а E2mc3-v1 имеют одинаковую последовательность tVR2, существенное различие в конформации (Фиг. 2С и Фиг. 9С), вероятно, является результатом различий в последовательности и структуре смежных VR3 и β-сэндвич петли в генотипах 1 и 6 (Фиг. 8В и Фиг. 9С). Изменение дизайна tVR2 имеет минимальный эффект по сравнению с недавними усеченными структурами E2_{ЕСТО} E2 из изолятов 1а53 и 1b09 генотипа 1 с bNAб НЕРС3/74 (Фиг. 6В и Фиг. 9D).

Пример 4 Конструкция и характеристика наночастиц, презентующих оптимизированные коры E2

[0093] Недавно, улучшенная иммуногенность у мышей была описана для наночастицы ферритина, несущей растворимый E2 (sE2, а. к. 384-661), который содержит три полноразмерные иммунодоминантные варибельные петли (Yan et al., J. Infect. Dis. [Epub ahead of print], 2019). В настоящей заявке авторы изобретения продемонстрировали их варианты E2mc3, которые только представляют консервативные эпитопы bNAб, на самособирающихся наночастицах в качестве кандидатов поливалентной вакцины против HCV (Фиг. 3А). Исследовали три платформы наночастиц: 24-мерный ферритин (FR, в качестве контроля) и 60-мерные E2p и I3-01, размером от 24,5 до 37,5 нм (Фиг. 3В). Авторы изобретения генетически сливали С-конец E2mc3-v1 с N-концом субъединицы наночастицы через линкер из 10-ти остатков (G4S)₂. Шесть конструкций временно экспрессировали в клетках ExpiCHO или 293 F и очищали на колонке AR3A с последующим проведением SEC (Фиг. 3С и Фиг. 10А). Для H77 SEC-профили показали существенный выход и чистоту для всех наночастиц, содержащих кор E2, с различными паттернами для 24- и 60-меров (Фиг. 3С). Для НК6а, уменьшенный выход наночастиц и чистота сопровождалась увеличенными низкомолекулярными видами (Фиг. 10А), предполагая что H77 tVR2 может быть несовместимым с НК6а и препятствовать агрегированию частицы. Однако

эффективная сборка частиц наблюдалась как в голубом нативном ПАГ электрофорезе (BN-PAGE), так и в электронной микроскопии с негативным окрашиванием (ЭМ) (Фиг. 3, D и E; Фиг. 10, B и C), а также усиленное связывание bNAb с наночастицами H77 (до 100-кратного изменения в EC₅₀) и отсутствие связывания с не-NAb, нацеленными на β-сэндвич петлю (Фиг. 3F и Фиг. 10 D-G). Наночастицы НК6а E2m3-v1 демонстрировали аналогичные, но генотип-специфичные профили. В БСИ, корреляция между пиковым сигналом и антигенной валентностью наблюдалась независимо от генотипа с 60-мерным > 24-мерным > мономером кора E2 (Фиг. 3G; Фиг. 10, H и I), что согласуется с наночастицами gp140 HCV авторов изобретения (He et al., Sci. Adv. 4, eaau6769, 2018).

Пример 5. Наночастицы, содержащие кор E2, вызывают более сильные иммунные ответы, чем кор E2

15 [0094] Авторы изобретения оценивали наночастицы с кором E2 H77 и НК6а у мышей BALB/c дикого типа в исследованиях №1 и №2, соответственно, с использованием короткой схемы (Фиг. 4A). Конструкции на основе I3-01, N. 2, не были включены из-за трудностей в получении наночастиц НК6а E2m3-v1-10GS-I3-01, как показано с помощью SEC (Фиг. 10A). В исследовании №1 три вакцины на основе H77 продемонстрировали корреляцию между E2-специфичным титром EC₅₀ и валентностью антигена на неделе 2 со значительными *P*-величинами (Фиг. 20 4B, верхняя панель; Фиг. 11, A и B). Хотя титры E2-специфичных антител продолжали расти, разница между тремя группами вакцин уменьшилась на 11 неделе. В исследовании №2 мы сравнили НК6а E2m3-v1, наночастицы E2p на его основе и смесь наночастиц НК6а/H77 E2m3-v1 E2p (Фиг. 4B, нижняя панель; 25 Фиг. 11, C и D). Группа НК6а E2m3-v1 E2p сохраняла свое преимущество в титре антител до 8 недели, тогда как ее аналог H77 сохранял его до 11 недели. Смесь E2p вызывала значительно более высокие титры H77, чем НК6а на протяжении иммунизации. В целом, наночастицы кора E2 индуцируют более 30 высокие титры антител, чем коры E2, хотя на долю E2 приходится только 42% (E2p) - 51% (FR) массы белка. Затем авторы изобретения оценили нейтрализацию сыворотки с помощью псевдочастиц HCV (HCVpp). В исследовании №1 аутологичная нейтрализация стабильно увеличивалась с течением времени с

различными временными паттернами (Фиг. 4С, верхняя панель). На неделе 2 группа FR продемонстрировала самую высокую нейтрализацию Н77, тогда как группа E2p продемонстрировала неожиданно самую низкую (Фиг. 4В, верхняя панель). Начиная с недели 5, сгруппированные FR демонстрируют более низкую
5 нейтрализующую активность со значительной *P*-величиной на неделе 11, в то время как группа E2p стала лучшей с статистической значимостью на неделях 8 и 11. Сыворотки 11 недели также нейтрализовали гетерологичные изоляты HCV1 (1a), J6 (2) и SA13 (5a) со значительными *P*-величинами для HCV1 и J6 (Фиг. 4С, нижняя панель). Аналогичную тенденцию наблюдали для группы №2 (Фиг. 4D),
10 и группа смеси E2p была эквивалентна группе E2p, только с НК6а. С помощью пяти HCV bNAbs и HCV bNAbs VRC01 валидировали анализы HCVpp (Фиг. 4E).

Пример 6. Отличительные паттерны В-клеточного ответа, индуцированного кором E2 и наночастицами

15 [0095] Авторы изобретения объединили антиген-специфичную сортировку В-клеток и NGS антитела для получения количественного считывания индуцированных вакциной В-клеточных ответов и определения паттернов В-клеток, связанных с различными платформами вакцин (Фиг. 5А). Авторы изобретения использовали зонд Н77 E2mc3-v1 с С-концевой Avi-меткой (Фиг.
20 12А) для сортировки E2-специфичных В-клеток селезенки от мышей в группах наночастиц Н77 E2mc3-v1 и E2p с помощью проточной цитометрии. Большая частота/количество E2-специфичных В-клеток наблюдалась для группы E2p со значительными *P*-величинами (Фиг. 5В и Фиг. 12В). Сортированные В-клетки от 10 мышей, по пять на группу, подвергали анализу секвенирования следующего поколения (NGS) и профилированию репертуара (Фиг. 12С). Группа E2p
25 использовала значительно больше (от 5 до 8) переменных генов тяжелой цепи (V_H), чем группа кора E2 (~1) (Фиг. 5С). Антитела, индуцированные E2p, содержали больше мутаций V_H со значительной *P*-величиной 0,0268 (Фиг. 5D). Различные паттерны длины HCDR3 наблюдались для двух групп, при этом
30 группа кора E2 имела две доминирующие длины HCDR3, в то время как группа E2p обеспечивала гораздо более широкое распределение (Фиг. 5E). Группа E2p продемонстрировала большее среднее значение RMSF – диапазон, в котором

изменяется длина петли, – чем группа коры E2 (4,5 а. к. против 1,1 а. к.) с P -величиной $<0,0001$.

Пример 7 NAb, индуцированные корой E2 и наночастицами E2, нацелены на различные эпитопы

[0096] Сыворотка мыши содержит неспецифическую противовирусную активность, которая может мешать проведению анализов HCVpp. Авторы изобретения очистили IgG мыши из исследования №1 на неделе 11 для нейтрализации H77 и SA13 HCVppс с начальным IgG в концентрации 100 мкг/мл с последующей серией трехкратных разведений (Фиг. 5F и Фиг. 13A). Для H77, в то время как ни одна из сывороток мышей в группе коры E2 не нейтрализовала $>60\%$ вирусов при первой концентрации, мыши #9 и #10 в группе E2p продемонстрировали плато, что указывает на сильные NAb в IgG, с аналогичной, но менее выраженной тенденцией для SA13. Непарные t -критерии показали значительную разницу между группами коры E2p и E2 для H77 ($P<0,0001$), но не для SA13 ($P=0,1680$). Группа FR занимала самое низкое место по нейтрализации сыворотки, но немного превосходила кор E2 в нейтрализации IgG (Фиг. 13A). Тем не менее, ферритин (FR) может не быть оптимальной платформой для дизайна вакцины против HCV на основе наночастиц. В данном случае, два эпитоп-специфических зонда были использованы для исследования индуцированных вакциной антител к двум известным bNAb эпитопам: переднему слою (FL, а. к. 421-459), интегральной с E2 нейтрализующей поверхностью (Tazgum et al., Front. Immunol. 9, 1315, 2018) и AS412 (Фиг. 5G, середина). Для презентации FL был разработан тримерный скаффолд, который был заякорен к каждой субъединице посредством сконструированной дисульфидной связи (Фиг. 13B). Этот тримерный FL-скаффолд экспонировался на FR. В ELISA группа E2p обеспечивала средний титр EC_{50} 4281 по сравнению с 3044 для группы E2mc3-v1 (Фиг. 5G, слева и Фиг. 13C). Тем не менее, непарный t -критерий показал незначительную P -величину 0,1192 между двумя группами (Фиг. 5G, слева). Тем не менее, экспонирование на наночастицах улучшает распознавание FL, включая антигенный сайт 434 (AS434, а. к. 434-446). Затем авторы изобретения использовали ранее разработанную наночастицу FR (He et al., Sci. Rep. 5:12501, 2015) (Фиг. 13B, внизу) для специфического ответа к зонду AS412. В ELISA

группа E2p продемонстрировала равномерный, устойчивый ответ на β -шпильку AS412 со средним титром EC₅₀ 5584, что в 38 раз больше, чем группа кора E2 с P-величиной <0,0001 (Фиг. 5G, справа и Фиг. 13C, внизу). Таким образом, экспонирование на частицах фокусирует ответ на консервативные эпитопы bNAbs.

5 Эти эпитопные зонды также предоставляют ценные инструменты для картирования эпитопов для оценки кандидатов вакцины против HCV.

Пример 8 Некоторые иллюстративные материалы и способы

[0097] Структурный дизайн усеченного VR2 (tVR2): Основываясь на

10 структуре bNAbs AR3C-связанного H77 E2c (идентификационный номер PDB: 4MWF), уже укороченную петлю VR2 в E2c, то есть сегмент между C452 и C494, вручную усекали путем удаления открытых гидрофобных остатков и дисульфидной связи (C459-C486), в результате чего получали конструкцию H77 E2mc3 (Фиг. 6A). Усеченный VR2 (tVR2) моделировали с помощью LOOPY

15 (Xiang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:7432-7437, 2002), программы моделирования и прогнозирования вращения и петель в пространстве. Затем выполняли изменение дизайна tVR2 с использованием способа дизайна белка *de novo* на основе ансамбля (Kong et al., Nat. Commun. 7:12040, 2016) с акцентом на N-концевую область пептидной последовательности PERASGHYPRP (SEQ ID

20 NO:62) между C452 и C494. Вкратце, ансамбль из 11-а.к. (G₆HYPRP) (SEQ ID NO:63) или 10-а.к. (G₅HYPRP) (SEQ ID NO:64) конформаций петли был создан для соединения C452 и C494 с использованием LOOPY. Для каждой конформации петли исходная последовательность для мультиглициновой (G_n) области была выбрана из пула из 50 случайных последовательностей, основанных

25 на потенциале RAPDF (Zhu et al., Proteins 65, 463-479, 2006) и подвергнута 500 стадиям имитационного отжига по методу Монте-Карло (MCSA) с линейным снижением температуры от 300 до 10К. Последовательность с наименьшей энергией для каждой петли регистрировали, и все конструкции, полученные из MCSA, ранжировали на основе энергии по завершении процесса. Наилучшие 5

30 конструкций из ансамблей G₆ и G₅, называемых H77 E2mc3-v1-v5 и v6-10, соответственно, были выбраны для экспериментальной валидации. Конструкции НК6а E2mc3 и E2mc3-v1 были сконструированы путем прямого принятия конструкций последовательностей H77 без дальнейших модификаций.

[0098] Экспрессия и очистка антигенов E2: Все коры E2 (E2c3, E2mc3 и E2mc3 v1-v10) и наночастицы на основе E2p временно экспрессировали в клетках HEK293 F (Thermo Fisher) для биохимического, биофизического и антигенного анализа. Вкратце, клетки 293 F оттаивали и инкубировали со средой для экспрессии FreeStyle™ 293 (Life Technologies, Калифорния) в шейкере-инкубаторе при температуре 37°C, 135 об./мин. и при содержании CO₂ 8%. Когда клетки достигали плотности $2,0 \times 10^6$ /мл, добавляли среду для экспрессии с целью снижения плотности клеток до $1,0 \times 10^6$ /мл для трансфекции полиэтиленимином (PEI) (Polysciences, Inc). Затем 900 мкг плазмиды в 25 мл среды для трансфекции Opti-MEM (Life Technologies, Калифорния) смешивали с 5 мл PEI-MAX (1,0 мг/мл) в 25 мл Opti-MEM. После 30-минутной инкубации к 1 л 293 F клеток добавляли комплекс ДНК-PEI-MAX. Супернатанты культуры собирали через пять дней после трансфекции, осветляли центрифугированием при 1800 об./мин. в течение 20 мин. и фильтровали с применением фильтров с размером пор 0,45 мкм (Thermo Scientific). Белки E2 экстрагировали из супернатантов с использованием колонки с антителами AR3A, как описано ранее (Long et al., *Science* 342, 1090-1094, 2013; и Tzarum et al., *Sci Adv* 5, eaav1882, 2019). Связанные белки элюировали три раза, каждый с 5 мл 0,2 М глицина (pH=2,2), и нейтрализовали 0,5 мл Tris-Base (pH=9,0). Белки дополнительно очищали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) на колонке Superdex 75 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) для коров E2 и на колонке Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare) для наночастиц E2p. Прикрепленный к E2mc3-v1 ферритин и наночастицы B-01 продуцировали в клетках ExpiCHO (Thermo Fisher). Вкратце, клетки ExpiCHO размораживали и инкубировали в присутствии экспрессионной среды ExpiCHO™ (Thermo Fisher) в шейкере-инкубаторе при температуре 37 °C и скорости вращения 135 об/мин в присутствии 8% CO₂. Когда клетки достигали плотности 10×10^6 мл⁻¹, добавляли экспрессионную среду ExpiCHO™ для снижения концентрации клеток до 6×10^6 мл⁻¹ для трансфекции. Комплексы ExpiFectamin™ CHO/плазмидная ДНК получали для трансфекции клеток ExpiCHO смесью в объеме 100 мл в соответствии с инструкциями изготовителя. Для этих двух наночастиц 100 мкг плазмиды и 320 мкл реагента ExpiFectamin™ CHO смешивали в 7,7 мл холодной среды OptiPRO™ (Thermo Fisher). После первого добавления смеси на первый день клетки ExpiCHO культивировали в

шейкер-инкубаторе при 32 °C при скорости вращения 120 об./мин в присутствии 8% CO₂ в соответствии с протоколом Max Titer с дополнительным добавлением смеси на пятый день (Thermo Fisher). Супернатанты культуры собирали на 13-14 день после трансфекции, очищали с помощью центрифугирования при 4000 об./мин в течение 20 мин и фильтровали с использованием фильтра с диаметром пор 0,45 мкм (Thermo Fisher). Колонку с антителами к AR3C использовали для экстракции прикрепленных к E2mc3 наночастиц из супернатантов, после чего проводили SEC на колонке с Superose 6 10/300 GL. Для коров E2 и наночастиц определяли концентрацию белка с применением UV₂₈₀ -поглощения с теоретическими коэффициентами экстинкции.

[0099] Голубой нативный электрофорез в полиакриламидном геле (BN-PAGE): Наночастицы с кором E2 HCV анализировали методом голубого нативного электрофореза в полиакриламидном геле (BN-PAGE) и окрашивали Кумасси голубым. Образцы белка смешивали с красителем для нанесения G250 и добавляли к 4 - 12% гелю Bis-Tris NuPAGE (Life Technologies). Гели BN-PAGE анализировали в течение 2,5 часов при напряжении 150 В с применением буфера для анализа NativePAGE™ (Life Technologies) согласно инструкциям производителя.

[00100] Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA): Каждая лунка 96-луночного аналитического планшета Costar™ (Corning) сначала была покрыта 50 мкл PBS, содержащего 0,2 мкг соответствующих антигенов. Планшеты инкубировали в течение ночи при 4 °C, а затем промывали пять раз промывочным буфером, содержащим PBS и 0,05% (об./об.) Tween 20. Затем каждую лунку покрывали 150 мкл блокирующего буфера, состоящего из PBS, 20 мг мл⁻¹ блокатора блоттинга (Bio-Rad) и 5% (об./об.) FBS. Планшеты инкубировали с блокирующим буфером в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем промывали пять раз промывочным буфером. В анализе образцов мыши сыворотку или плазму разбавляли 50-кратно в блокирующем буфере и подвергали серии 10-кратных разведений. Для каждого разведения образца в лунки добавляли в общей сложности 50 мкл объема. Каждый планшет инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем промывали пять раз промывочным буфером. Затем в промывочный буфер добавляли 1:2000 разведение козьего антитела против IgG мыши, меченного пероксидазой хрена

(HRP) (Jackson ImmunoResearch Laboratories), с добавлением 50 мкл этого разбавленного вторичного антитела в каждую лунку. Планшеты инкубировали с вторичным антителом в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем промывали пять раз промывочным буфером. Наконец, лунки анализировали с 50 мкл ТМВ (Life Sciences) в течение 3-5 минут перед остановкой реакции с применением 50 мкл 2 н. серной кислоты. Полученные показания планшета измеряли при длине волны 450 нм.

[00101] Биослойная интерферометрия (БСИ): Кинетику связывания коров E2 и связывания наночастицы с антителами, специфичными к HCV, измеряли с применением прибора Octet Red96 (fortéBio, Pall Life Sciences). Все анализы проводили при встряхивании, заданном на 1000 об./мин., в однократном кинетическом буфере fortéBio. Конечный объем всех растворов составил 200 мкл на лунку. Анализы проводили при температуре 30 °С в твердых черных 96-луночных планшетах (Geiger Bio-One). 5 мкг мл⁻¹ антитела в однократном кинетическом буфере загружали на поверхность захватывающих биосенсоров против Fc человека (АНС) для коров E2 и количественных биосенсоров против Fc человека (АНQ) для наночастиц в течение 300 с. Перед анализом ассоциации антитела на биосенсоре с антигеном в растворе в течение 200 с проводили стадию получения базовой линии биосенсора в течение 60 с. В шести сериях титрования использовали двукратный градиент концентрации антигена, начиная с 3,57 мкМ для коров E2 и 52,08 нМ для наночастиц, в зависимости от размера. Диссоциацию взаимодействия отслеживали в течение 300 с. Коррекцию сдвига базовой линии проводили посредством вычитания усредненного сдвига, зарегистрированного для сенсора с нанесенным антителом, но не инкубированного с антигеном, или сенсора без антитела, но инкубированного с антигеном. Данные, полученные на приборе Octet, обрабатывали с применением программного обеспечения для получения данных FortéBio v.8.1. Экспериментальные данные были аппроксимированы уравнениями связывания, описывающими взаимодействие 2:1 для достижения оптимальной аппроксимации. Следует отметить, что связывание E2mc3-v1 также измеряли с использованием АНQ для облегчения сравнения сигналов связывания антитела с наночастицами.

[00102] Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК): Температурные кривые плавления коров гликопротеинов E2 HCV получали с

помощью калориметра MicroCal VP-Capillary (Malvern). Перед проведением анализа на приборе проводили замену буфера очищенных гликопротеинов E2, полученных из клеток 293S, на 1×PBS, и концентрировали до 27–50 мкМ. Плавление исследовали при скорости сканирования 90 °С·ч⁻¹ от 25 °С до 110 °С.

5 Обработку данных, включая корректировку с учетом буфера, нормирование и вычитание базовой линии, проводили с применением стандартизированного протокола программного обеспечения Origin 7.0.

[00103] Экспрессия и очистка белка для кристаллизации: Конструкции E2 экспрессировали и очищали, как описано выше. Fabs AR3A и AR3B

10 экспрессировали и очищали, как описано ранее Giang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109:6205-6210, 2012). mAb очищали на аффинной колонке с белком G с последующей эксклюзионной хроматографией с использованием колонки Superdex-200 (Pharmacia) в 50 мМ буфере NaCl, 20 мМ Tris-HCl (pH=7,2).

[00104] Кристаллизация и структурное определение комплекса НК6а E2c3 –

15 Fab E1 – AR3A – белок G. Комплекс НК6а E2c3 – Fab E1 – AR3A получали путем инкубации в течение ночи очищенных E2 и Fab в молярном соотношении 1:1,2:1,25 (E2:Fab E1:Fab AR3A) при комнатной температуре с последующей эксклюзионной хроматографией (Superdex-200) для удаления несвязанных Fab с использованием 20 мМ Tris и 50 мМ буфера NaCl (pH=7,2). Эксперименты по

20 кристаллизации проводили с использованием высокопроизводительной роботизированной системы CrystalMation™ (Rigaku) авторов изобретения с использованием пародиффузионного способа сидячей капли (размер капли 0,3 мкл) при 20 °С, и приводили к получению кристаллов, дифрактировавших до ~5 Å. Для улучшения разрешения кристаллов перед экспериментом по

25 кристаллизации к комплексу НК6а E2c3 – Fab E1 – AR3A в молярном соотношении 1:2 (комплекс: белок G) добавляли домен III белка G (запись в PDB -1IGC). Эти эксперименты привели к получению кристаллов НК6а E2c3 - Fab E1 – AR3A – белок G, которые дифрактировали до 3,40 Å. Кристаллы получали с использованием резервуарного раствора 0,2 М хлорида магния, 10% (масс./об.)

30 ПЭГ 3000, 15% этиленгликоля, 0,1 М Na-какодилата, pH=6,5. Перед сбором данных кристаллы мгновенно охлаждали в жидком азоте. Наборы данных о дифракции собирали в Stanford Synchrotron Radiation Lightsource (SSRL). Данные интегрировали и масштабировали с использованием HKL2000, а структуру

разрешали способом молекулярной замены с использованием Phaser с НК6а E2c3 - AR3A (запись в PDB - 6BKB) в качестве модели поиска. Уточнение структуры проводили в Phenix, и построение модели - с помощью COOT.

[00105] Кристаллизация и структурное определение комплексов E2mc3 - Fab:

5 Эксперименты по кристаллизации проводили для H77 E2mc3, H77 E2mc3v-1, H77 E2mc3v-6, НК6а E2mc3 и НК6а E2mc3v-1 в комплексе с AR3A, AR3B, AR3C и AR3D Fab. Комплексы E2-Fab получали путем инкубации в течение ночи очищенных E2 и Fab в молярном соотношении 1:1,25 (E2:Fab) при комнатной температуре с последующей эксклюзионной хроматографией (Superdex-200) для
10 удаления несвязанных Fab с использованием 20 mM Tris и 50 mM буфера NaCl (pH=7,2). Скрининг по кристаллизации с использованием высокопроизводительной роботизированной системы CrystalMation™ (Rigaku) авторов изобретения с использованием пародиффузионного способа сидячей капли (размер капли 0,3 мкл) при 20 °C приводил к получению кристаллов, H77
15 E2mc3-v1 - AR3C, H77 E2mc3-v6 - AR3C и НК6а E2mc3-v1 - AR3B, дифрактировавших до 1,90 Å, 2,85 Å, и 2,06 Å, соответственно. Кристаллы комплекса H77 E2mc3-v1-AR3C получали с использованием резервуарного раствора 20% (масс./об.) ПЭГ 3500, 0,2 М гидрофосфата диамония; комплекса H77 E2mc3-v6-AR3C из 20% (масс./об.) ПЭГ 3500, 0,2 М Na-тиоцианата, pH=6,9;
20 и комплекса НК6а E2mc3-v1-AR3B из 20% (масс./об.) ПЭГ 8000, 0,1 М NEPES pH=7,5. Перед сбором данных кристаллы H77 E2mc3-v6 - AR3C и НК6а E2mc3-v1 - AR3B подвергали криопротекции 10-15% этиленгликолем и мгновенно охлаждали в жидком азоте. Наборы данных о дифракции собирали на усовершенствованном источнике фотонов (APS). Данные интегрировали и
25 масштабировали с использованием HKL2000. Структуры определяли методом молекулярной замены с использованием Phaser с H77 E2c - AR3C или НК6а E2c3 - AR3B (запись в PDB - 4MWF или 6BKC) в качестве модели поиска. Уточнение структуры проводили в Phenix, и построение модели - с помощью COOT.

[00106] Электронная микроскопия с негативным окрашиванием (ЭМ): ЭМ

30 эксперименты были проведены в центре микроскопии института Скриппса. Вкратце, образцы наночастиц готовили в концентрации 0,01 мг/мл. Медные сетки с углеродным покрытием (400 меш) подвергали воздействию тлеющего разряда, и 8 мкл каждого образца адсорбировали в течение 2 минут. Избыток образца

удаляли, а сетки негативно окрашивали 2% формиатом уранила в течение 2 минут. Избыточное окрашивание удаляли, и сетки оставляли высыхать. Образцы анализировали при 80 кВ с помощью просвечивающего электронного микроскопа Talos L120C (Thermo Fisher), а изображения получали с помощью камеры СЕТА 16М CMOS.

[00107] Иммунизация мышей и отбор образцов: Руководящие принципы Комитета по уходу за животными и их использованию (IACUC) были соблюдены на животных субъектах, протестированных в исследовании иммунизации.

Восьминедельные мыши BALB/c были приобретены у The Jackson Laboratory.

- 10 Мышей помещали в вентилируемые клетки в помещениях с контролируемой окружающей средой в TSRI в соответствии с утвержденным протоколом IACUC и рекомендациями AAALAC. На неделе 0 каждую мышь иммунизировали 200 мкл смеси антиген/адьювант, содержащей 50 мкг антигена и 100 мкл адьюванта AddaVax (Invivogen), в соответствии с инструкцией производителя
- 15 внутримышечным (*в/м*) путем. На неделях 3, 6 и 9 животных стимулировали 50 мкг антигена, приготовленного в адьюванте AddaVax. На неделе 11 животные подвергались терминальному кровотечению через ретроорбитальную мембрану с использованием гепаринизированных капиллярных трубок. Образцы разбавляли равным объемом PBS, а затем накладывали на 4,5 мл Ficoll/Histopaque в 15 мл пробирке SepMate (StemCell) и центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 мин при 20 °С для отделения плазмы и клеток. Плазму инактивировали нагреванием при 56 °С в течение 30 мин., центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 мин, и стерильно фильтровали. Клетки промывали один раз в PBS, а затем ресуспендировали в 1 мл буфера для лизиса эритроцитов ACK (Lonza).
- 25 После двух циклов промывки PBS, PBMC ресуспендировали в 2 мл Vambanker Freezing Media (Lymphotec Inc.). Селезенки также собирали и пропускали через сетчатый фильтр 40 мкм (BD Falcon) для высвобождения спленоцитов в клеточную суспензию. Клетки центрифугировали, промывали в PBS, обрабатывали 10 мл буфера для лизиса эритроцитов в соответствии со
- 30 спецификациями производителя и ресуспендировали в среде Vambanker для замораживания клеток. В то время как сыворотку и плазму использовали в анализах нейтрализации HCVpp, 80% сыворотки отдельных мышей в исследовании №1 (9, 10 и 10 в группах 1, 2 и 3 соответственно) очищали с

использованием набора для спин-теста с 0,2 мл белка G (Thermo Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Очищенные IgG использовали для оценки поликлонального ответа NAb в сыворотке в анализах HCVpp.

5 [00108] Анализ нейтрализации HCV: Анализы псевдотипированных частиц HCV (HCVpp) использовали для оценки нейтрализующей активности индуцированного вакциной ответа антител в сыворотке крови мышей, а также синтезированных антител из анализа секвенирования следующего поколения (NGS) В-клеток селезенки мышей, сортированных по объему. Вкратце, HCVpps 10 были получены путем совместной трансфекции клеток 293Т плазмидой pNL4-3.lucR-E- и соответствующими экспрессионными плазмидами, кодирующими гены E1E2, в соотношении 4:1 полиэтиленимином, как описано ранее Bazzill et al., *Nano Lett.* **18**:7832-7838, 2018. Нейтрализацию *in vitro* проводили на клетках Huh7.5 с использованием однократного разведения 1:50 для сывороток мышей и трех концентраций (10мкг/мл, 1,0мкг/мл и 0,1мкг/мл) для антител. Кривые 15 полной нейтрализации определяли для IgG, выделенных от мыши в исследовании №1 против аутологичного H77 (1a) и гетерологичного SA13 (5a), с начальной концентрацией IgG 100 мкг/мл и серией трехкратных разведений.

20 [00109] Объемная сортировка В-клеток мыши, специфичных к E2 HCV: Селезенки собирали у иммунизированных мышей через 15 дней после последней иммунизации, и готовили клеточную суспензию. Клетки окрашивали следующим образом: мертвые клетки исключали путем окрашивания с помощью набора для окрашивания фиксируемых мертвых клеток Aqua (Thermo Fisher L34957). Рецепторы FcγIII (CD16) и FcγII (CD32) блокировали путем добавления 20 мкл 2,4G2 mAb (BD Pharmigen N553142). Затем клетки инкубировали с 10 мкг/мл 25 биотинилированного белка E2mc3 HCV. Вкратце, E2mc3 получали путем биотинилирования отдельного Avi-меченого HCV E2mc3 с использованием биотиновой лигазы BigA в соответствии с инструкциями производителя (Avidity LLC). Избыток биотина удаляли методом SEC на колонке Superdex 200 (GE Healthcare). В SEC-профиле пик Avi-меченого E2mc3 центрируется на уровне 30 14,5 мл, в то время как более широкий пик биотинлигазы можно обнаружить на уровне 18-23 мл. Клетки и биотинилированные белки инкубировали в течение 5 мин при 4 °С с последующим добавлением 2,5 мкл антитела против IgG мыши, флуоресцентно меченого FITC (Jackson ImmunoResearch 115-095-071), и

инкубировали в течение 15 мин при 4 °С. Наконец, к клеткам добавляли 5 мкл аллофикоцианин(АРС)-меченого стрептавидина высшего сорта и инкубировали в течение 15 мин при 4 °С. На каждой стадии клетки промывали DPBS, и сортировочный буфер представлял собой 0,5 мл буфера FACS. FITC⁺ APC⁺

5 E2mc3-специфические В-клетки отсортировали с использованием BD FACSAria II в пробирку Эппендорфа с 500 мкл буфера FACS.

[00110] Секвенирование следующего поколения (NGS) и биоинформационный анализ В-клеток мыши: Приведены данные протокола 5'-быстрой амплификации концов кДНК (RACE) для несмещенного секвенирования репертуаров В-клеток

10 мыши. См. He *et al.*, *Sci. Adv.* 4, eaau6769, 2018; и Morris *et al.*, *mBio* 8, e00036-00017, 2017. В данном случае этот протокол применяли к В-клеткам селезенки мышей, специфичным к E2, отсортированным по объему. Вкратце, кДНК 5'-RACE получали из объемно-сортированных В-клеток селезенки каждой мыши с помощью набора SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit для секвенирования

15 (TaKaRa). ПЦР на иммуноглобулин проводили с помощью высокоточной ДНК-полимеразы *Platinum Taq* (Life Technologies) в общем объеме 50 мкл, с 5 мкл кДНК в качестве матрицы, 1 мкл праймера 5'-RACE и 1 мкл обратного праймера 10 мкМ. Праймер 5'-RACE содержал адаптор PGM/S5 P1, в то время как обратный праймер содержал адаптор PGM/S5 A. Авторы изобретения

20 адаптировали внутренние праймеры мыши 3'-Cγ1-3/3'-Cμ и внешний праймер 3'-mCκ в качестве обратных праймеров для 5'-RACE ПЦР-обработки тяжелых и легких (κ) цепей. В общей сложности было проведено 25 циклов ПЦР, и

ожидаемые продукты ПЦР (500-600 п.о.) были очищены с применением геля (Qiagen). NGS выполняли на системе Ion S5 GeneStudio. Вкратце, библиотеки тяжелой и легкой (κ) цепей одной и той же мыши количественно оценивали с помощью флуорометра Qubit® 2.0 с набором для анализа Qubit® dsDNA HS, а затем смешивали, используя соотношение 3:1, перед объединением с

библиотеками антител других мышей в равном соотношении для секвенирования. Подготовку матрицы и загрузку чипа (Ion 530) выполняли на Ion Chef с использованием набора Ion 520/530 Ext Kit с последующим секвенированием на системе Ion S5, с применением настроек по умолчанию. Конвейер обработки данных антител мыши (*Antibodyomics*) использовали для обработки необработанных данных и определения распределения для использования генов

зародышевой линии, соматической гипермутации (SHM), расхождения зародышевой линии и длины петли H/KCDR3.

[00111] Перечень некоторых последовательностей, раскрытых в настоящей заявке.

5 **[00112]** E2 (H77 генотип 1a) (SEQ ID NO:1), остатки полипротеина HCV
384–746

ETHVTGGSAGHTTAGLVGLLTPGAKQNIQLINTNGSWHINSTALNCNDSLTTG
WLAGLFYRHKFNSSGCPERLASCRRLTDF AQGWGPISYANGSGLDERPYCWH
YPPRPCGIVPAKSVC GPVYCFT PSPVVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFLNN
10 TRPPLGNWFGCTWMNSTGFTK VCGAPPCVIGGVGNNTLLCPTDCFRKHPEATY
SRCGSGPWITPRCMVDYPYRLWHYPCTINYTIFKVRMYVGGVEHRLEAACNW
TRGERCDLEDRDRSELSPLLLSTTQWQVLPCSFTTLPALSTGLIHLHQNIVDVQY
LYGVGSSIASWAIKWEYVLLFLLADARVC SCLWMMLLISQAEA

15 **[00113]** E2ΔTM (H77 изолят) (SEQ ID NO:2), остатки полипротеина HCV
384–717

ETHVTGGSAGHTTAGLVGLLTPGAKQNIQLINTNGSWHINSTALNCNDSLTTG
WLAGLFYRHKFNSSGCPERLASCRRLTDF AQGWGPISYANGSGLDERPYCWH
YPPRPCGIVPAKSVC GPVYCFT PSPVVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFLNN
TRPPLGNWFGCTWMNSTGFTK VCGAPPCVIGGVGNNTLLCPTDCFRKHPEATY
20 SRCGSGPWITPRCMVDYPYRLWHYPCTINYTIFKVRMYVGGVEHRLEAACNW
TRGERCDLEDRDRSELSPLLLSTTQWQVLPCSFTTLPALSTGLIHLHQNIVDVQY
LYGVGSSIASWAIKWE

[00114] E2c (изолят H77) (SEQ ID NO:3), сконструированная последовательность кора

25 QLINTNGSWHINSTALNCNESLNTGWLAGLFYQHKFDSSGCPERLASCGSSGC
WHYPPRPCGIVPAKSVC GPVYCFT PSPVVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFL
NNTRPPLGNWFGCTWMNSTGFTK VCGAPPCVIGGVGDNTLLCPTDCFRKHPE
ATYSRCGSGPWITPRCMVDYPYRLWHYPCTINYTIFKVRMYVGGVEHRLEAA
CN (подчеркнута область VR2 с нарушением порядка)

30 **[00115]** E2c3 (изолят H77) (SEQ ID NO:4), сконструированная последовательность кора

QLINTNGSWHINSTALNCNESLNTGWLAGLFYQHKFDSSGCPERLASCGSSGC
WHYPPRPCGIVPAKSVC GPVYCFT PSPVVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFL

NNTRPPLGNWFGCTWMNSTGFTKVCGAPPGGPTDGGSGPWITPRCMVDYPYR
LWHYPCTINYTIKVRMYVGGVEHRLEAACN (подчеркнута область VR2 с
нарушением порядка)

[00116] E2mc3 (SEQ ID NO:26), модифицированный кор E2

5 QLINTNGSWHINSTALNCNESLNTGWLGLFYQHKFDSSGCPERASGHYPRPC
GIVPAKSVCGPVYCFTPSPVVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFLNNTGNWF
GCTWMNSTGFTKVCGAPPGGPTDGGSGPWITPRCMVDYPYRLWHYPCTINYTI
FKVRMYVGGVEHRLEAACN (последовательность tVR2 подчеркнута)

[00117] Варианты 1-10 E2mc3 (SEQ ID NO:27-36): мотив PERSAG (SEQ ID

10 NO:52) заменен соответственно последовательностями 6 а. к. или 5 а. к.,
представленными в SEQ ID NO:11-20.

[00118] E2mc3 (генотип ба НК6а), модифицированный кор E2 (SEQ ID NO:37)

15 QLINTNGSWHINRTALNCNDSLQTFITSLFYAKNVDSSGCPERASGHYPRPCD
VVSARTVCGPVYCFTPSPVVVGTTDKLGIPTYNWGENETDVFMLESLGGWFG
CTWMNSTGFTKTCGAPPGGPTDGGSGPWITPRCLVDYPYRLWHYPCTVNFTL
HKVRMFVGGIEHRFDAACN (последовательность tVR2 подчеркнута)

[00119] E2mc3 (генотип ба НК6а) вариант 1 (SEQ ID NO:38):

20 QLINTNGSWHINRTALNCNDSLQTFITSLFYAKNVDSSGCQNWDEPHYPRPC
DVVSARTVCGPVYCFTPSPVVVGTTDKLGIPTYNWGENETDVFMLESLGGWF
GCTWMNSTGFTKTCGAPPGGPTDGGSGPWITPRCLVDYPYRLWHYPCTVNFT
LHKVRMFVGGIEHRFDAACN (измененные остатки в tVR2 подчеркнуты)

[00120] последовательности tVR2 вариантов E2mc3 1-10: CQNWDEPHYPRPC

(SEQ ID NO:65), CKVNIDPHYPRPC (SEQ ID NO:66), CEKVEELHYPRPC (SEQ
ID NO:67), CPDENMKHYPRPC (SEQ ID NO:68), СКРЕЕКМНHYPRPC (SEQ ID
25 NO:69), СРКТЕVНHYPRPC (SEQ ID NO:70), СКRVDIНHYPRPC (SEQ ID NO:71),
СPSDMVНHYPRPC (SEQ ID NO:72), СPNEEEHНHYPRPC (SEQ ID NO:73), и
СККЕIRНHYPRPC (SEQ ID NO:74).

[00121] Таким образом, настоящее изобретение было раскрыто в общих чертах

30 и проиллюстрировано со ссылкой на типичные варианты реализации, описанные
выше. Следует понимать, что возможны различные модификации настоящего
изобретения в пределах его сущности и объема.

[00122] Также дополнительно следует отметить, что все публикации, номера доступа последовательностей, патенты и патентные заявки, цитированные в настоящей заявке, таким образом специально включены посредством ссылки в полном объеме и для всех целей, как если бы каждая из них была отдельно включена в настоящую заявку. Определения, содержащиеся в тексте и включенные посредством ссылки, исключены в случаях их противоречия определениям согласно настоящему изобретению.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

1. Модифицированный полипептид эктодомена E2 вируса гепатита С (HCV), содержащий сконструированную последовательность эктодомена E2, которая содержит по меньшей мере одну модификацию, выбранную из (а) усечения в области VR2 с нарушением порядка и (b) делеции в β -сэндвич-петле, соединяющей β -листы 6 и 7 β -сэндвич-домена.
2. Модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV по п. 1, отличающийся тем, что указанная сконструированная последовательность эктодомена E2 содержит SEQ ID NO:4, ее вариант с консервативными модификациями или по существу идентичную ей последовательность.
3. Модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV по п. 2, отличающийся тем, что усечение области VR2 с нарушением порядка включает замену остатков 41-61 SEQ ID NO:4, CPERLASCSSGSGCWHYPPRPC (SEQ ID NO:6), на CPERASGHYPPRPC (SEQ ID NO:10).
4. Модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV по п. 2, отличающийся тем, что усечение области VR2 с нарушением порядка включает замену остатков 41-61 SEQ ID NO:4, CPERLASCSSGSGCWHYPPRPC (SEQ ID NO:6) последовательностью, представленной в CXXXXXXHYPPRPC (SEQ ID NO:8) или CXXXXXXHYPPRPC (SEQ ID NO:9), где X представляет собой любой аминокислотный остаток.
5. Модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV по п. 4, отличающийся тем, что XXXXXX в SEQ ID NO:8 представляет собой QNWDEP (SEQ ID NO:11), KVNIDP (SEQ ID NO:12), EKVEEL (SEQ ID NO:13), PDENMK (SEQ ID NO:14) или KREEKM (SEQ ID NO:15).
6. Модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV по п. 4, отличающийся тем, что XXXXX в SEQ ID NO:9 представляет собой PKTEV (SEQ ID NO:16), KRVDI (SEQ ID NO:17), PSDMV (SEQ ID NO:18), PNEEE (SEQ ID NO:19) или KKEIR (SEQ ID NO:20).
7. Модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV по п. 2, отличающийся тем, что делеция последовательности β -сэндвич петли (SEQ ID

NO:21) включает делецию одного или более остатков, которые образуют кончик указанной β -сэндвич петли.

8. Модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV по п. 7, отличающийся тем, что остатки, которые образуют указанный кончик β -сэндвич 5 петли, представляют собой остатки 543-546 из SEQ ID NO:4.

9. Модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV по п. 7, отличающийся тем, что остатки 543-546 из SEQ ID NO:4, RRPL (SEQ ID NO:22), удалены.

10. Модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV по п. 1, 10 который содержит как указанное усечение в области VR2 с нарушением порядка, так и указанную делецию в β -сэндвич петле.

11. Модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV по п. 10, 15 который содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:26-38, ее вариант с консервативными модификациями или по существу идентичную ей последовательность.

12. Полинуклеотид, кодирующий модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV по п. 1.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV по п. 1 и фармацевтически приемлемый носитель.

20 14. Композиция вакцины, содержащая модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV по п. 1, который экспонирован на поверхности самособирающейся наночастицы.

25 15. Композиция вакцины по п. 14, отличающаяся тем, что С-конец указанного модифицированного полипептида эктодомена E2 HCV слит с N-концом субъединицы указанной самособирающейся наночастицы через линкерную последовательность.

16. Композиция вакцины по п. 15, отличающаяся тем, что указанная линкерная последовательность содержит (GGGGGS)₂ (SEQ ID NO:42).

17. Композиция вакцины по п. 14, отличающаяся тем, что указанный модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:26-38, ее вариант с консервативными модификациями или по существу идентичную ей

5 последовательность.

18. Композиция вакцины по п. 14, отличающаяся тем, что субъединица указанной самособирающейся наночастицы содержит полипептид, представленную в SEQ ID NO:39 (E2p), SEQ ID NO:40 (I3-01) или SEQ ID NO:41 (ферритин), его вариант с консервативными модификациями или по существу

10 идентичную ему последовательность.

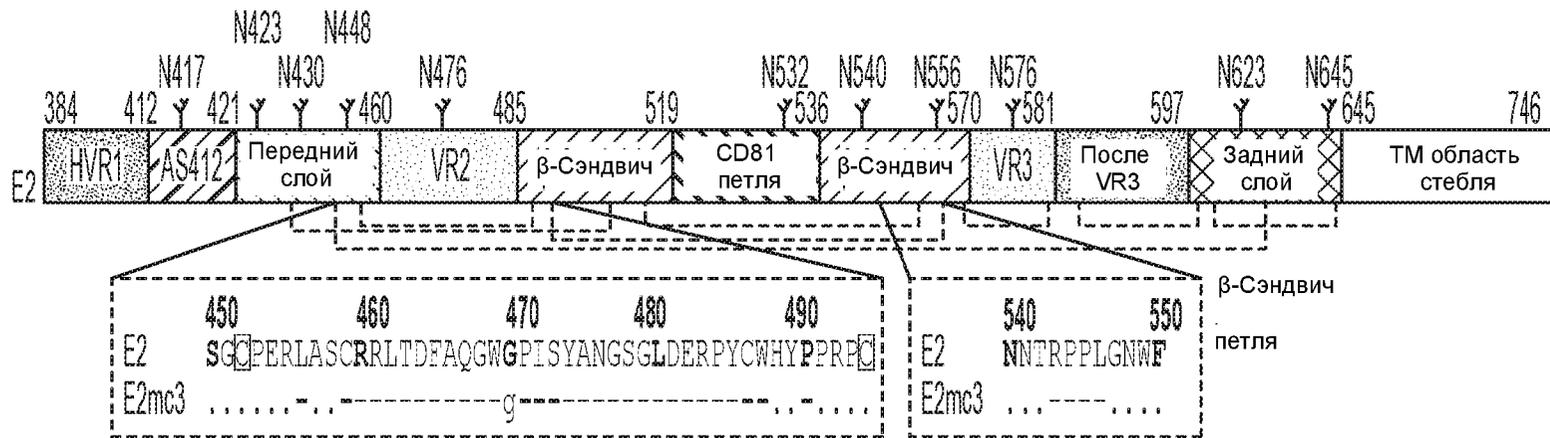
19. Полинуклеотид, кодирующий слитый белок, содержащий модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV по п. 1 и субъединицу самособирающейся наночастицы, причем указанный модифицированный полипептид эктодомена E2 HCV слит на своем С-конце с N-концом указанной

15 субъединицы самособирающейся наночастицы.

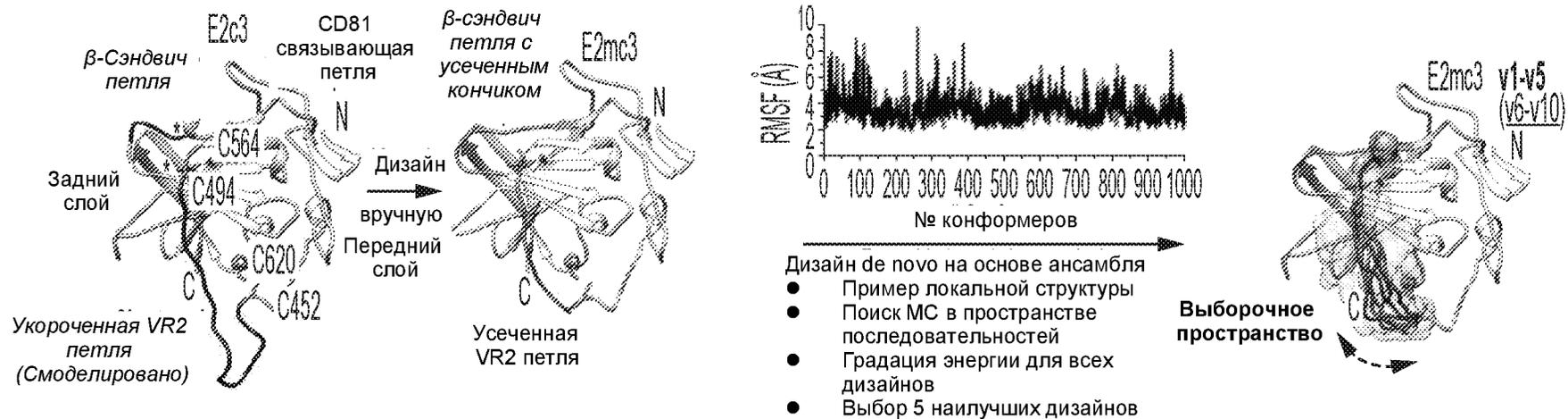
20. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию вакцины по п. 14 и фармацевтически приемлемый носитель.

21. Способ лечения или предотвращения инфекции HCV у субъекта, включающий введение указанному субъекту фармацевтической композиции,

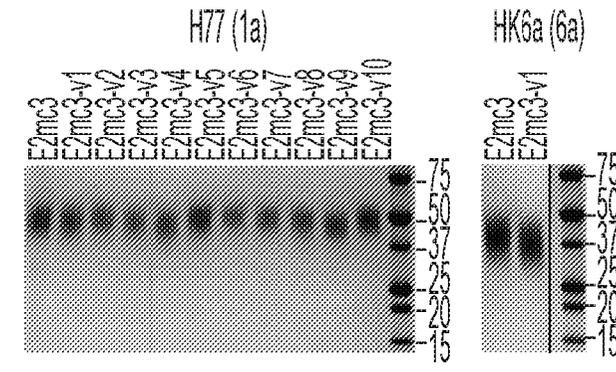
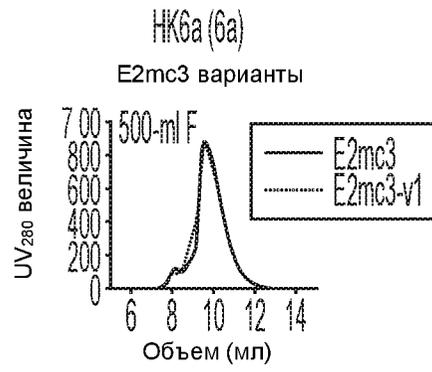
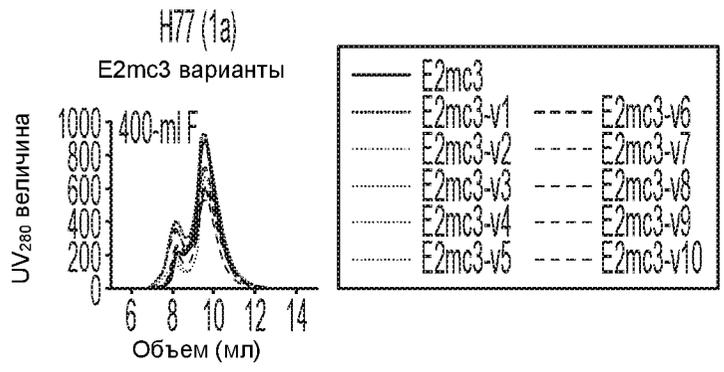
20 содержащей терапевтически эффективное количество композиции вакцины по п. 14, что таким образом обеспечивает лечение или предотвращение инфекции HCV у указанного субъекта.



ФИГ. 1А

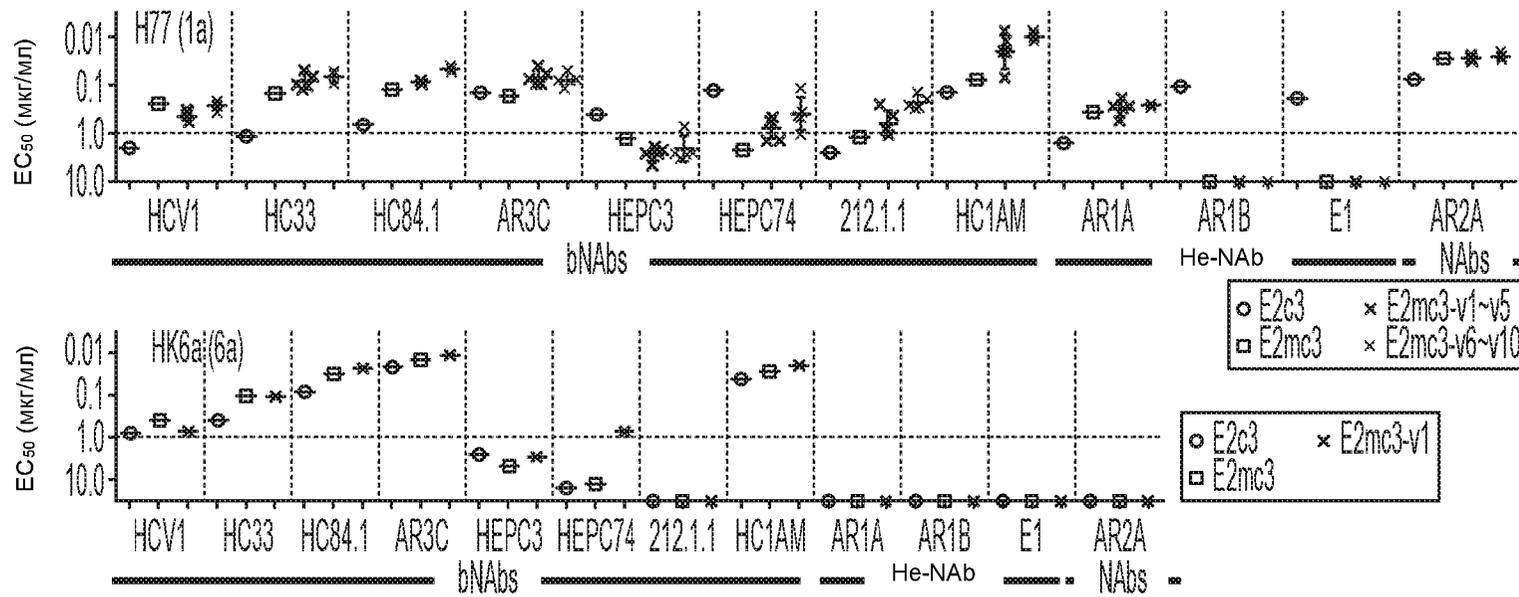


ФИГ. 1В

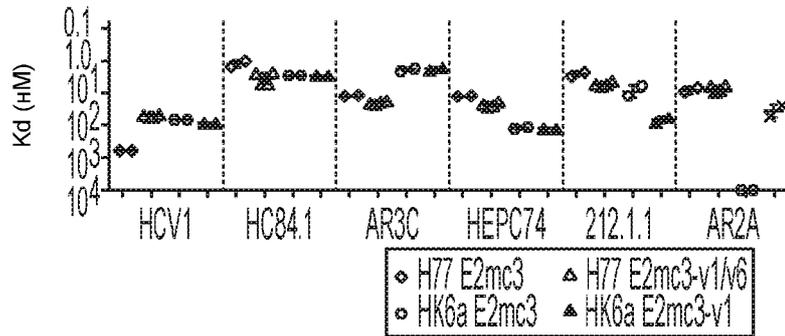


ФИГ. 1С

ФИГ. 1D



ФИГ. 1E



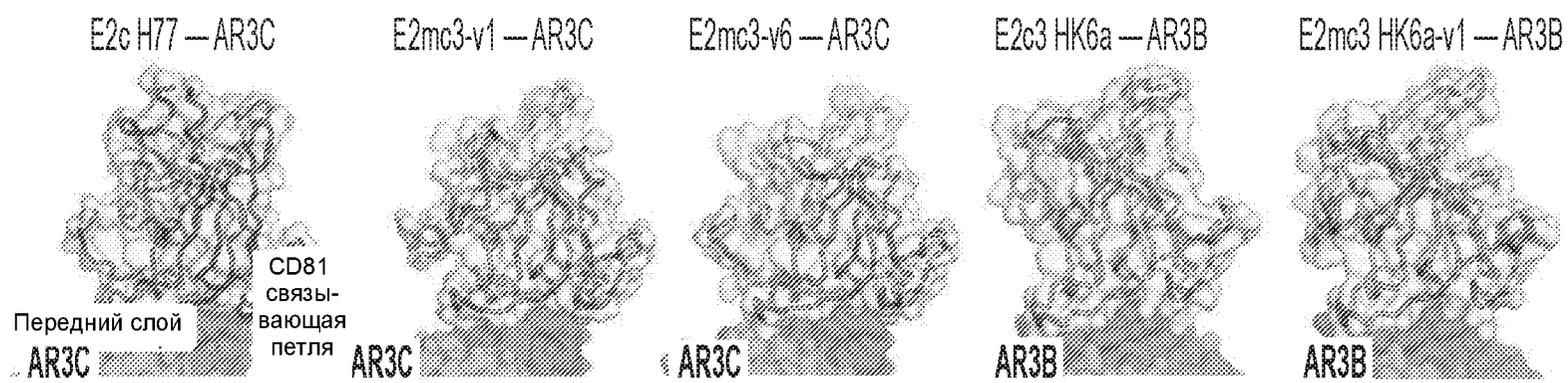
ФИГ. 1F

Термостабильность коров E2, полученных из генотипов 1 и 6 HCV^a

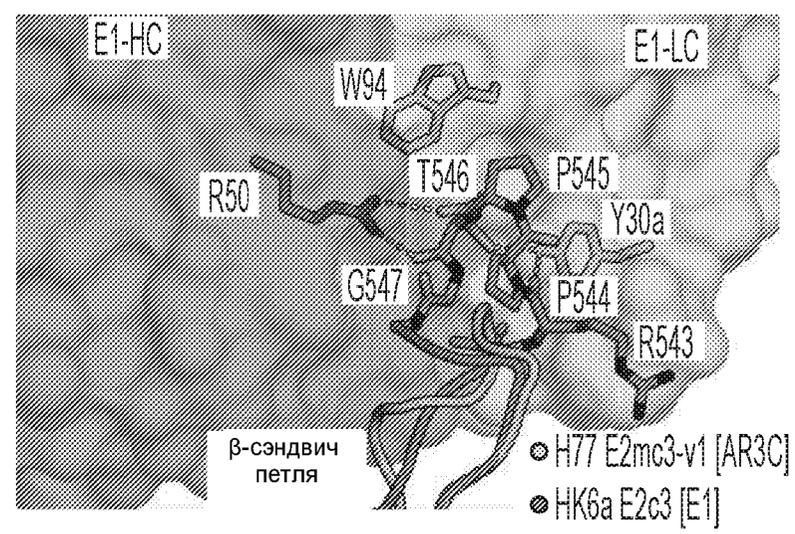
	H77 (1a)				HK6a (6a)		
	E2c3	E2mc3	E2mc3-v1	E2mc3-v6	E2c3	E2mc3	E2mc3-v1
$T_m(^{\circ}\text{C})$	75.7	79.9	80.9	80.1	78.0	77.9	79.4
$\Delta T_{1/2}(^{\circ}\text{C})$	10.8	9.5	9.5	9.3	8.5	8.9	10.0

^a T_m и $\Delta T_{1/2}$ получены из различных анализов сканирующей калориметрии (ДСК)

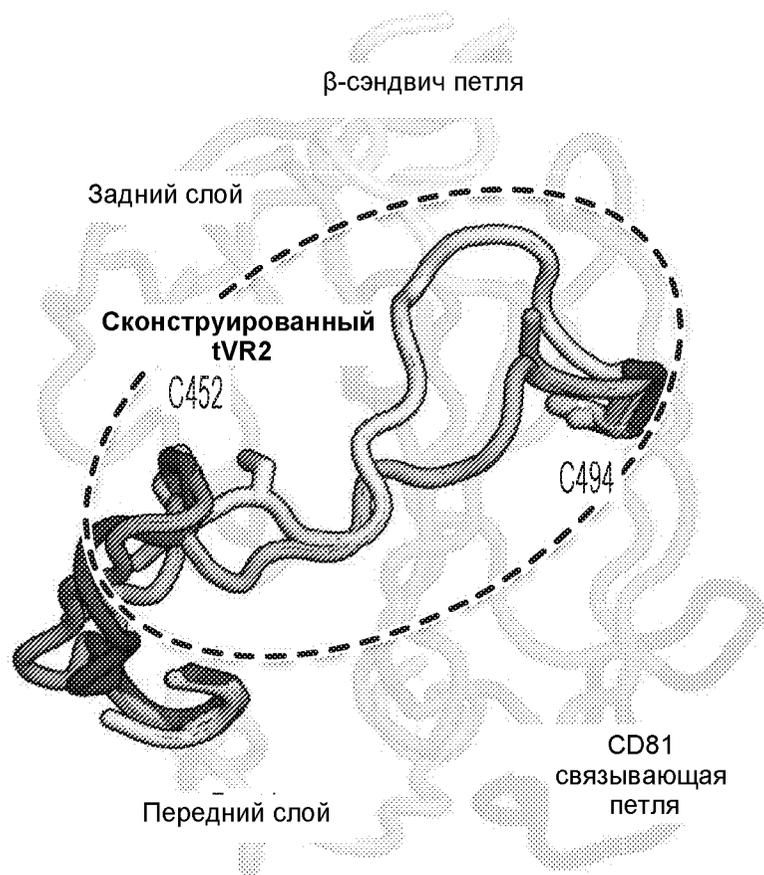
ФИГ. 1G



ФИГ. 2А

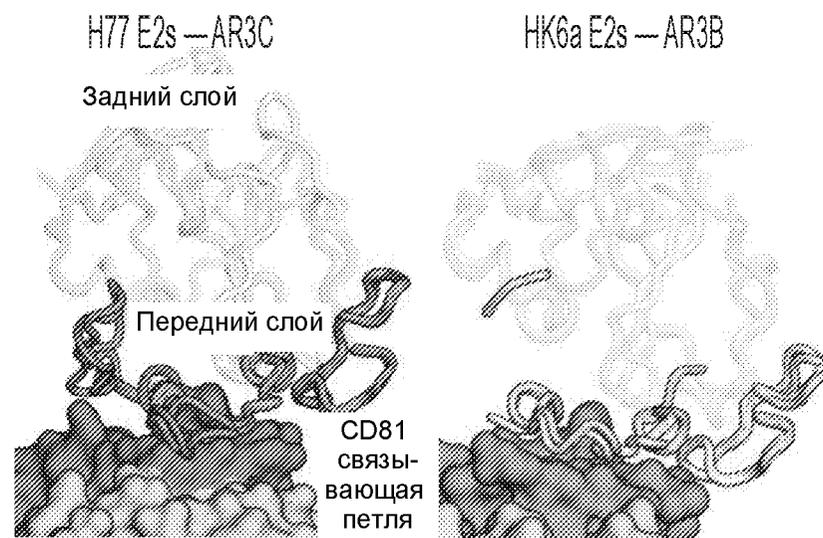


ФИГ. 2В



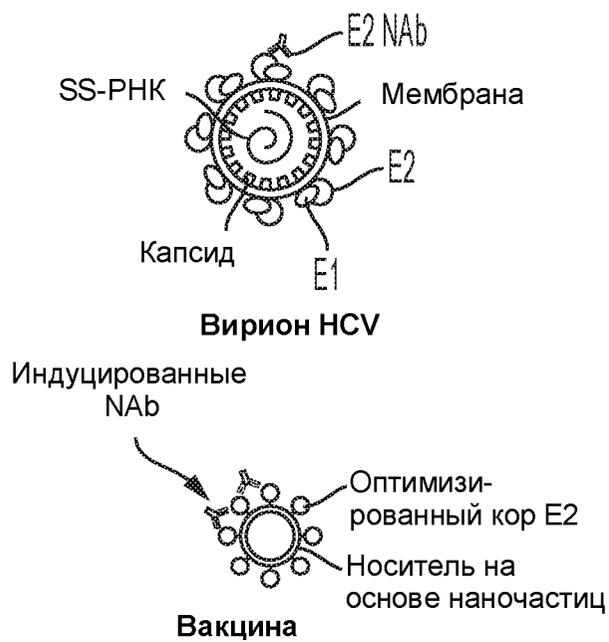
- H77 E2c
- H77 E2mc3-v1
- H77 E2mc3-v6
- HK6aE2mc3
- HK6a E2mc3-v1

ФИГ. 2С

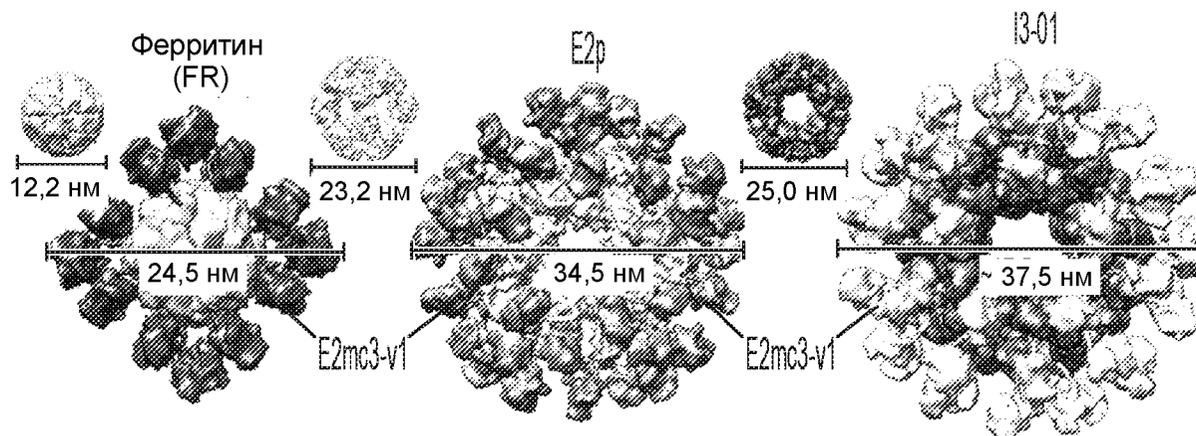


5/60

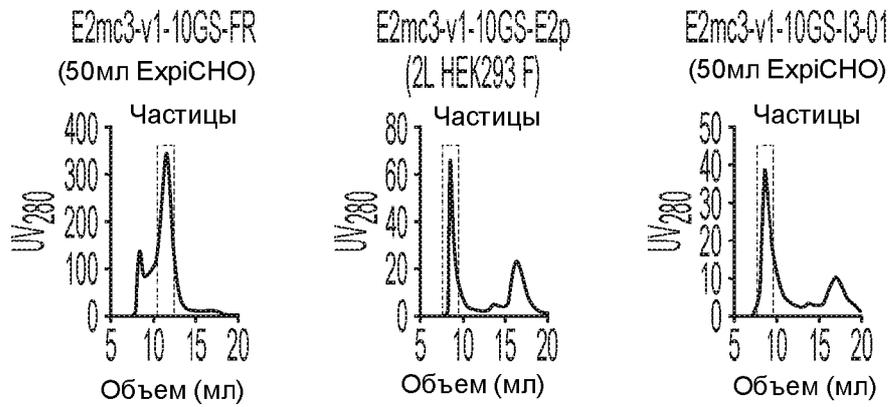
ФИГ. 2D



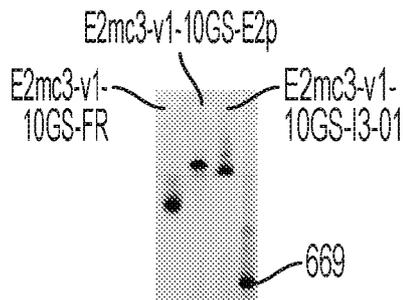
ФИГ. 3А



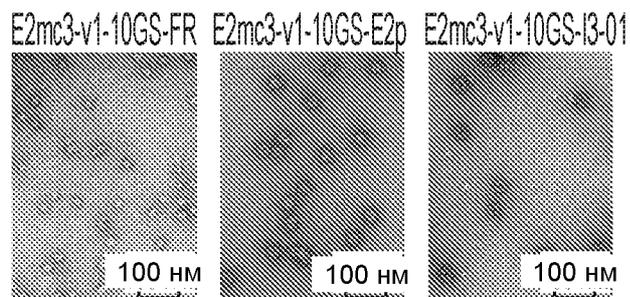
ФИГ. 3В



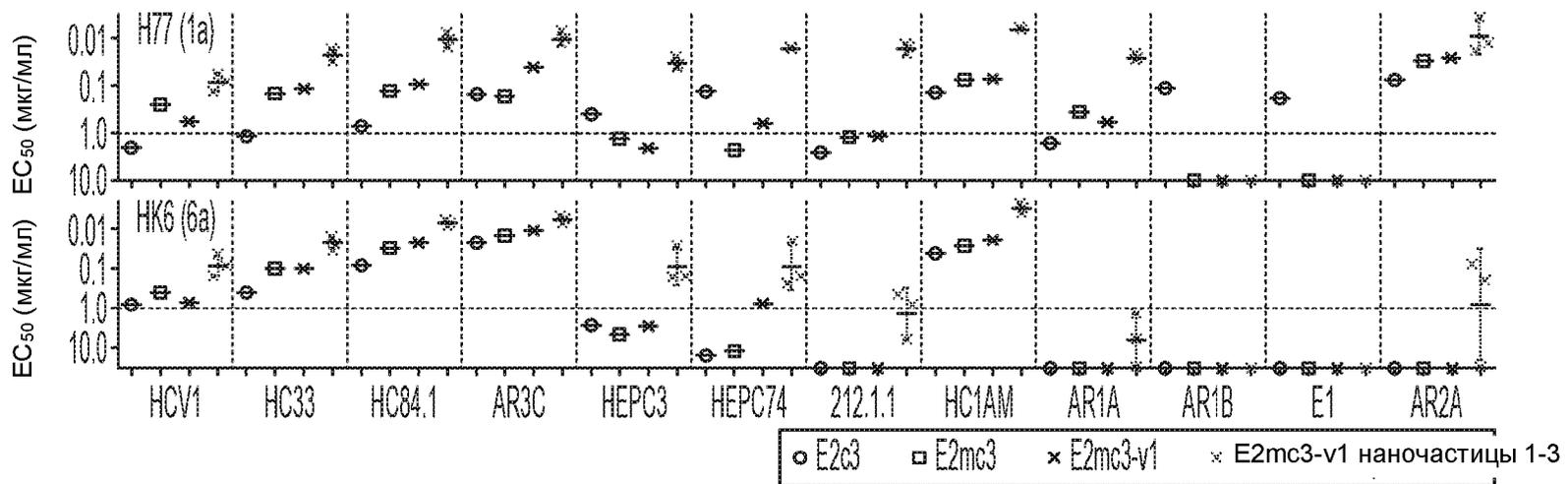
ФИГ. 3С



ФИГ. 3D



ФИГ. 3Е

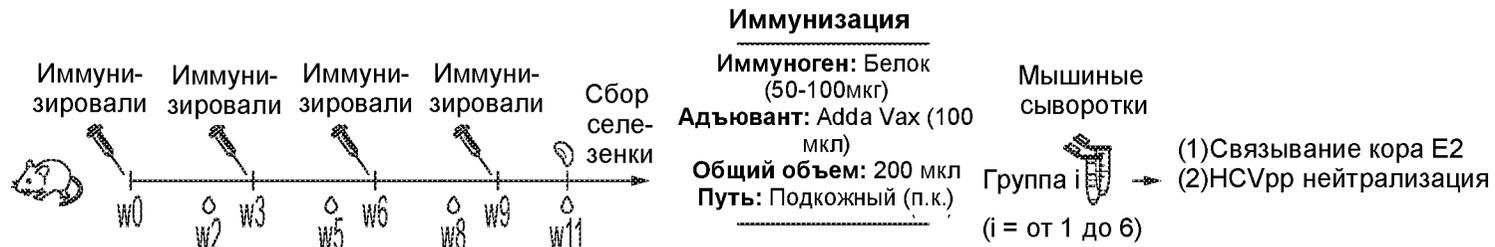


ФИГ. 3F

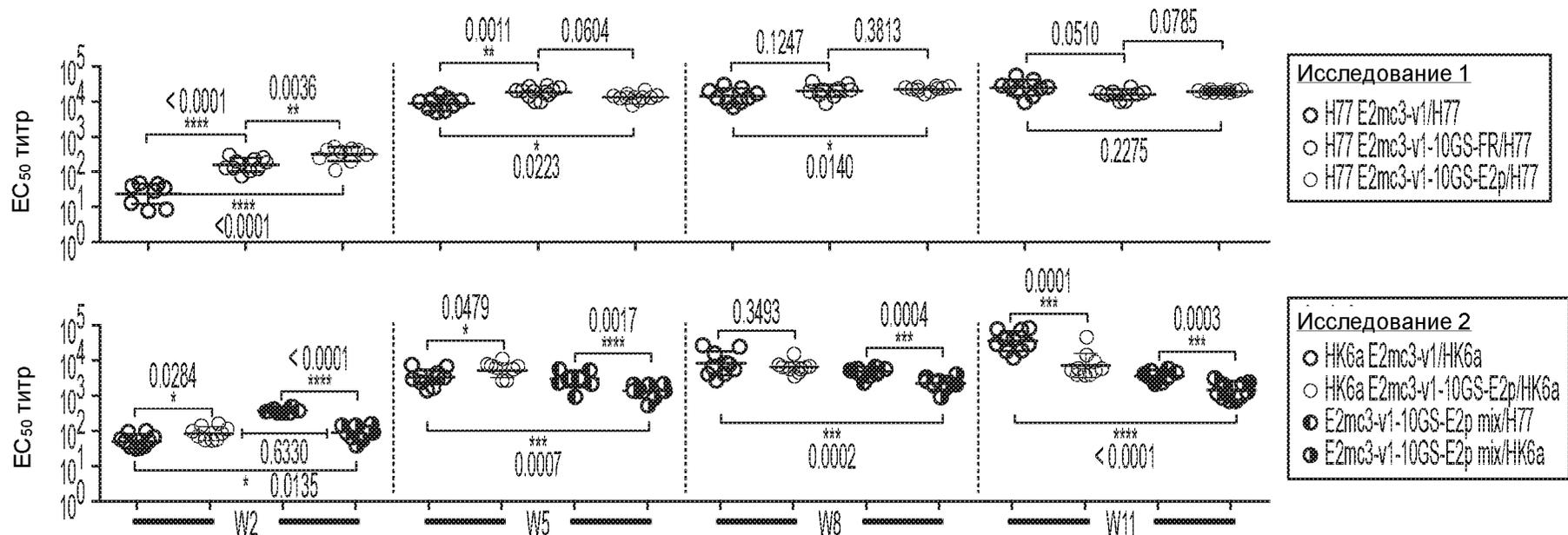
Иммуногены кора E2

	HCV1	HC84.1	AR3C	HEP374	212.1	AR2A	HCV1	HC84.1	AR3C	HEP374	212.1.1	AR2A
E2mc3-v1	0.23	0.28	0.25	0.35	0.25	0.10	0.19	0.27	0.21	0.19	0.08	0.04
E2mc3-v1-10GS-FR	0.51	1.00	0.93	0.77	0.45	0.80	0.61	1.53	1.37	1.27	0.68	0.19
E2mc3-v1-10GS-E2p	0.53	1.14	1.21	0.97	0.56	1.25	1.12	0.92	1.04	1.60	1.14	0.42
E2mc3-v1-10GS-I3-01	0.89	1.81	1.72	1.44	0.86	1.33	1.15	1.91	1.27	1.77	1.28	0.41

ФИГ. 3G

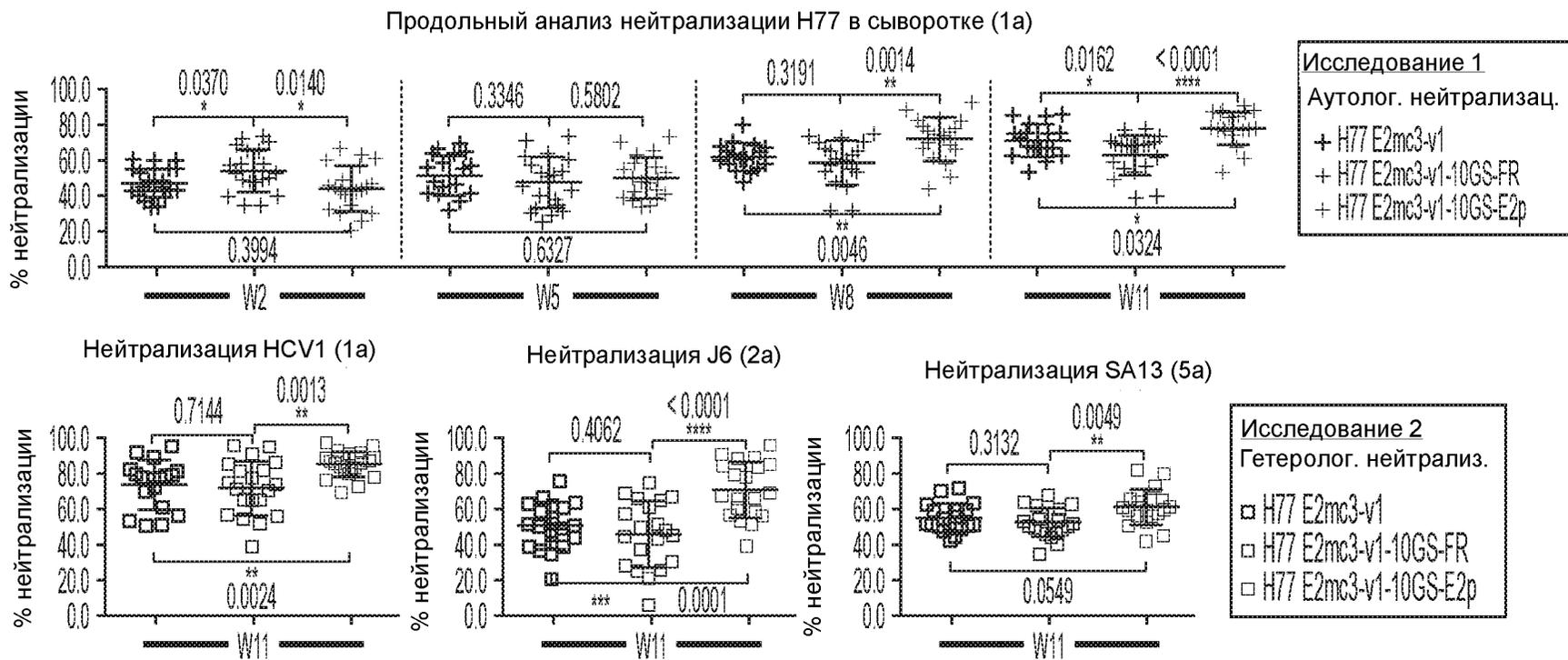


ФИГ. 4А

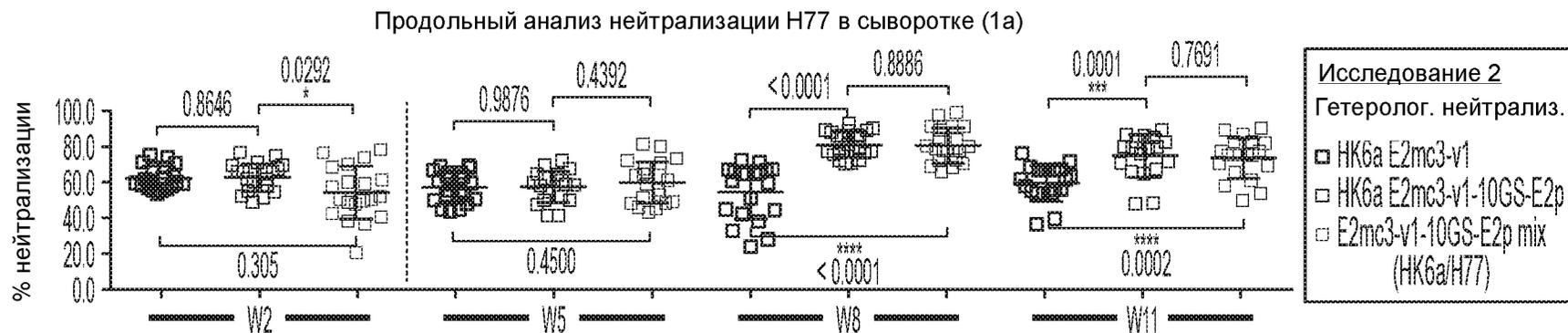


09/6

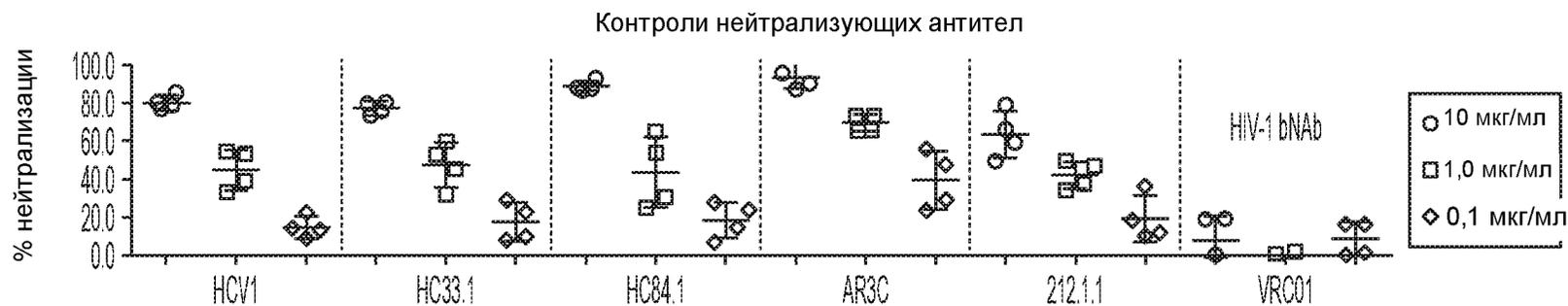
ФИГ. 4В



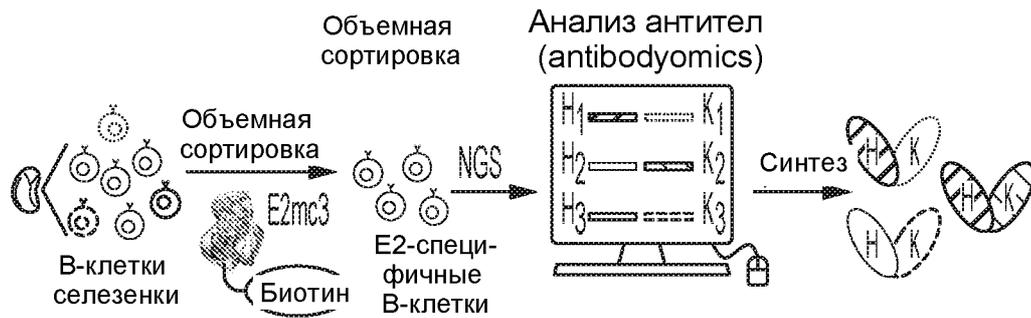
ФИГ. 4С



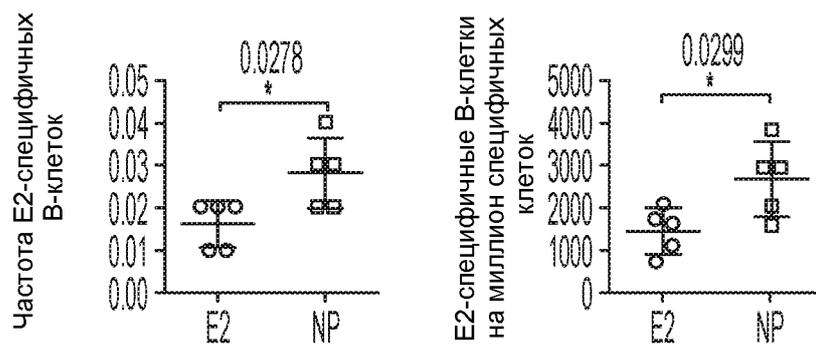
ФИГ. 4D



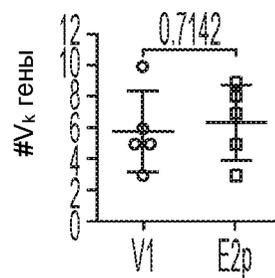
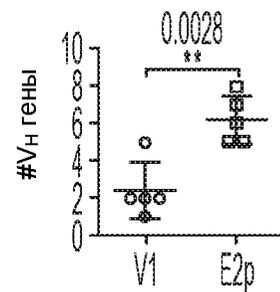
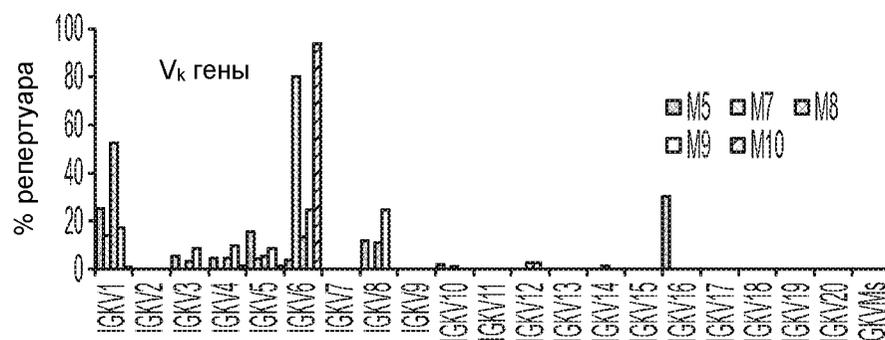
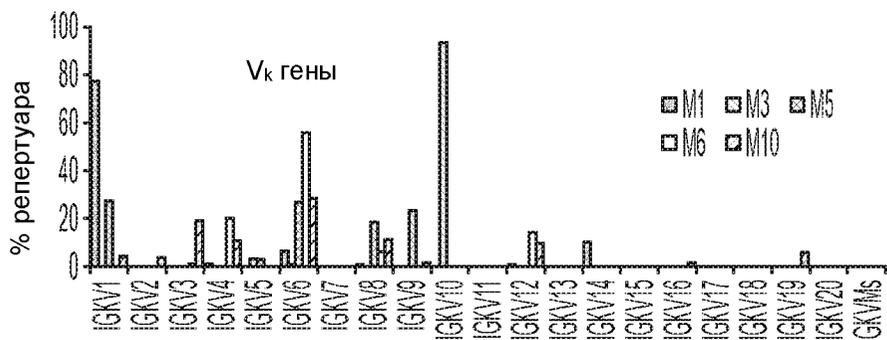
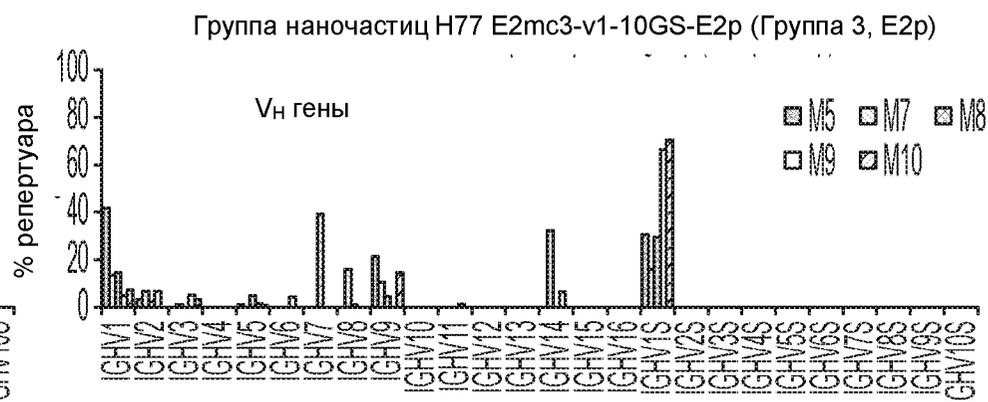
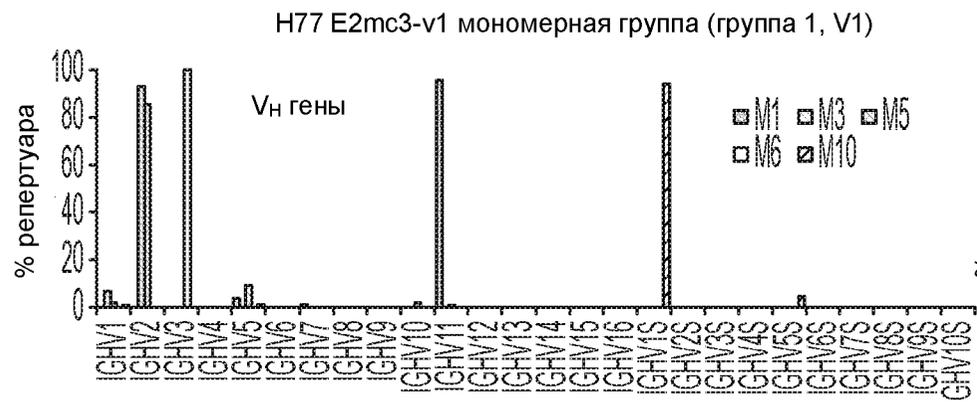
ФИГ. 4E



ФИГ. 5А

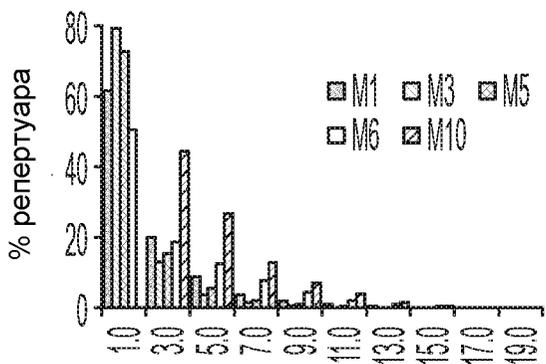


ФИГ. 5В

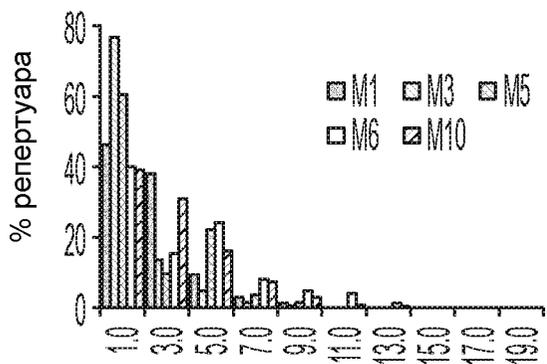


13/60

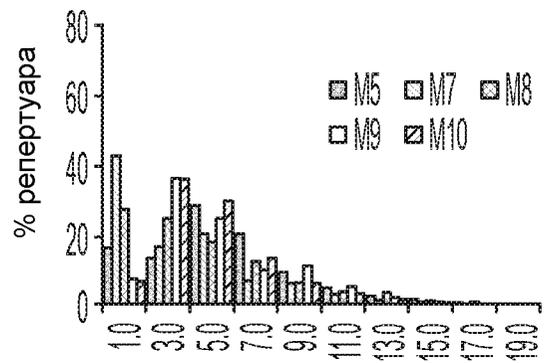
ФИГ. 5С



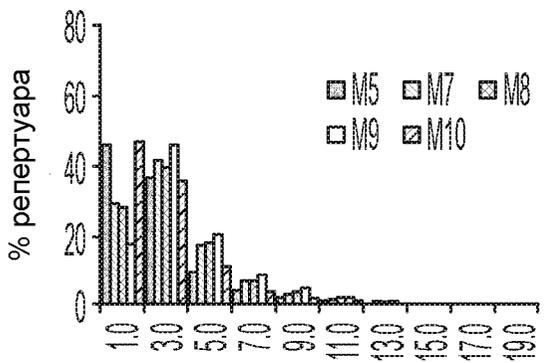
Дивергенция V_n зародышевой линии (%)



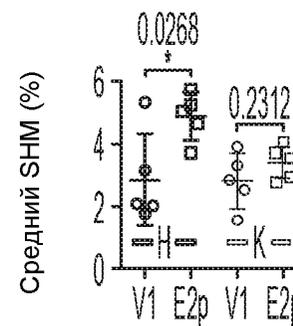
Дивергенция V_k зародышевой линии (%)



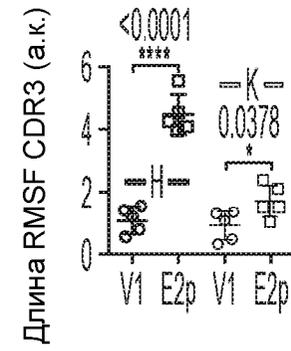
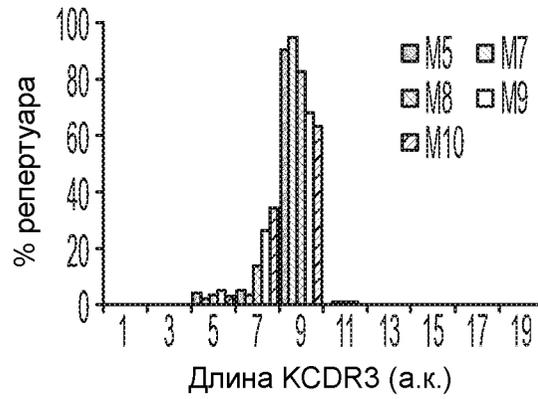
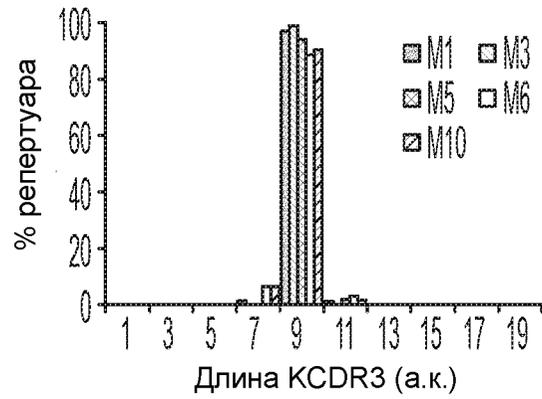
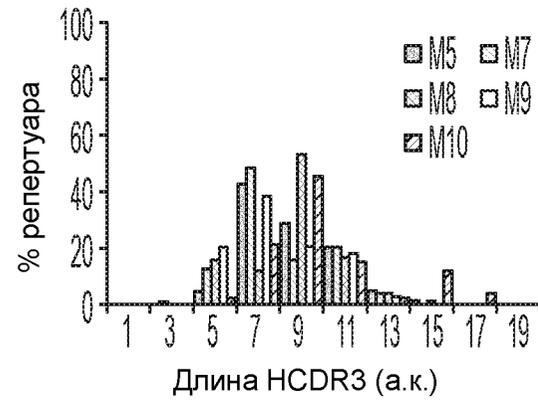
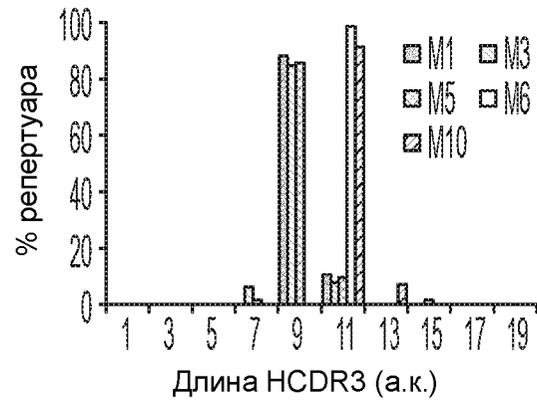
Дивергенция V_n зародышевой линии (%)



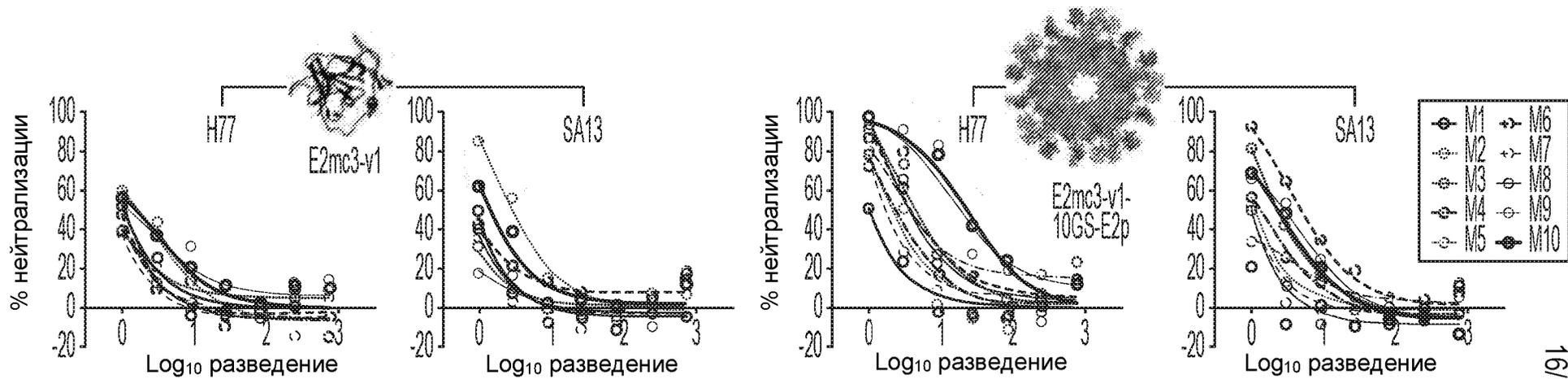
Дивергенция V_k зародышевой линии (%)



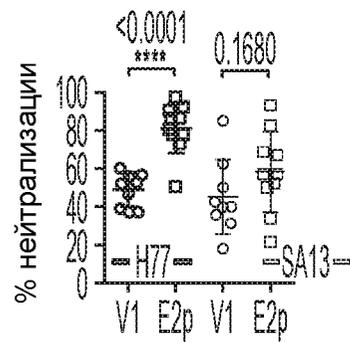
ФИГ. 5D



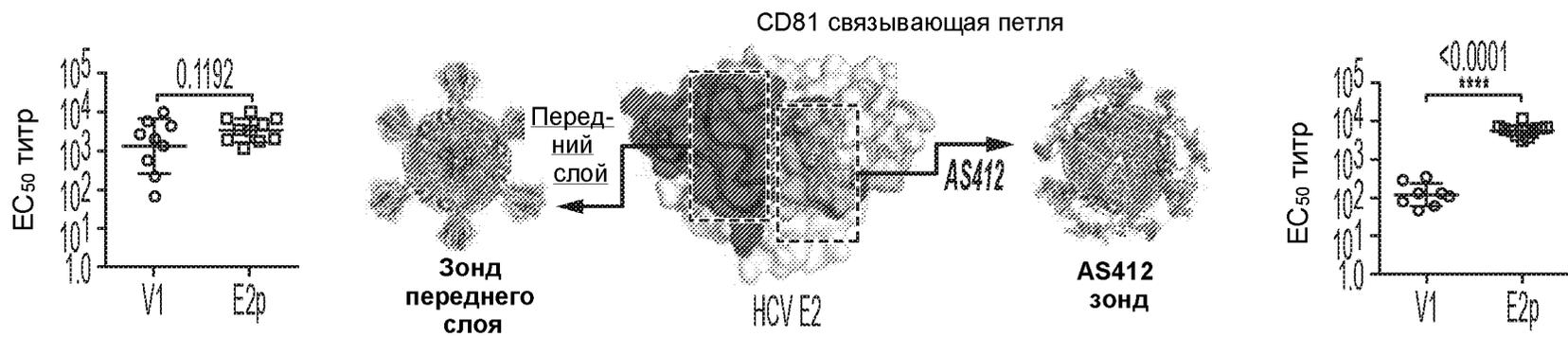
ФИГ. 5Е



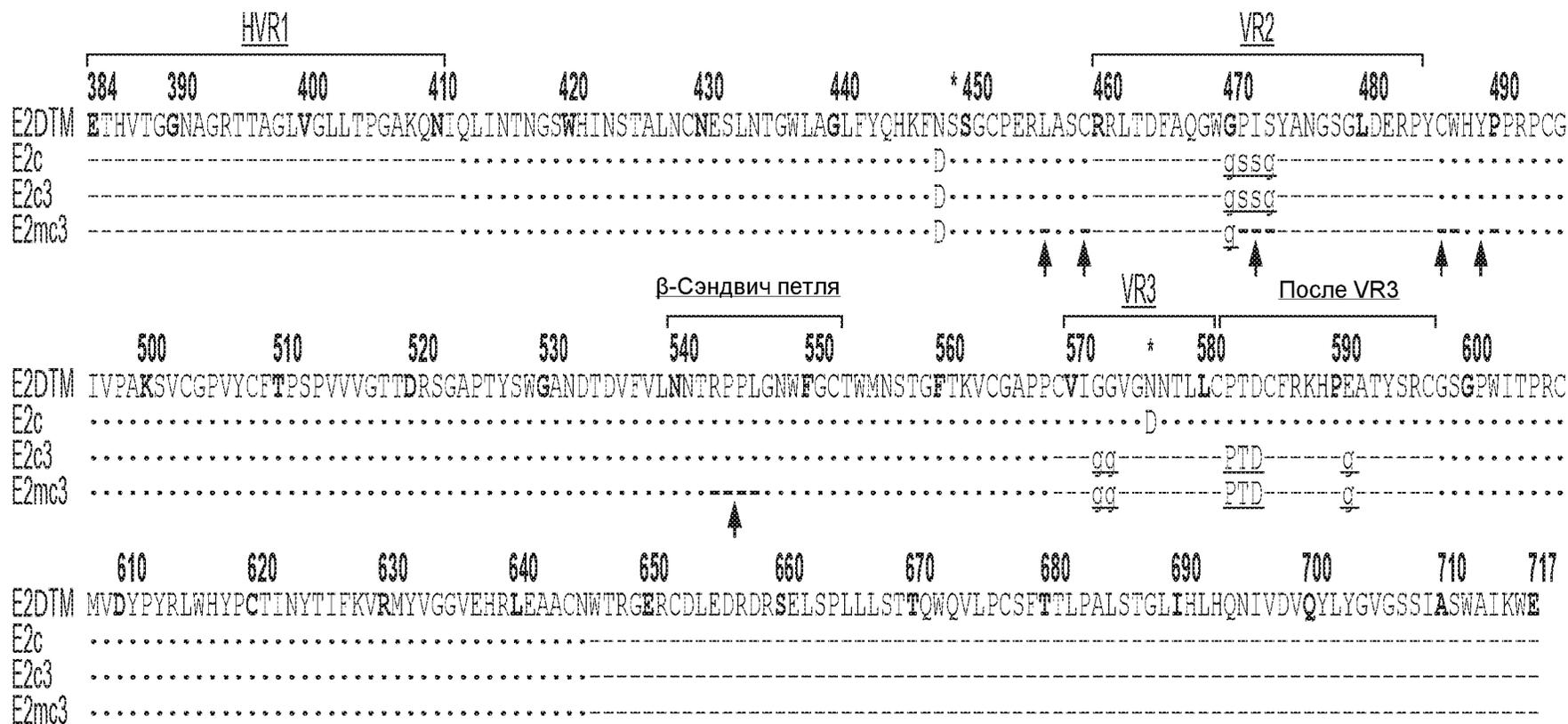
16/60



ФИГ. 5F

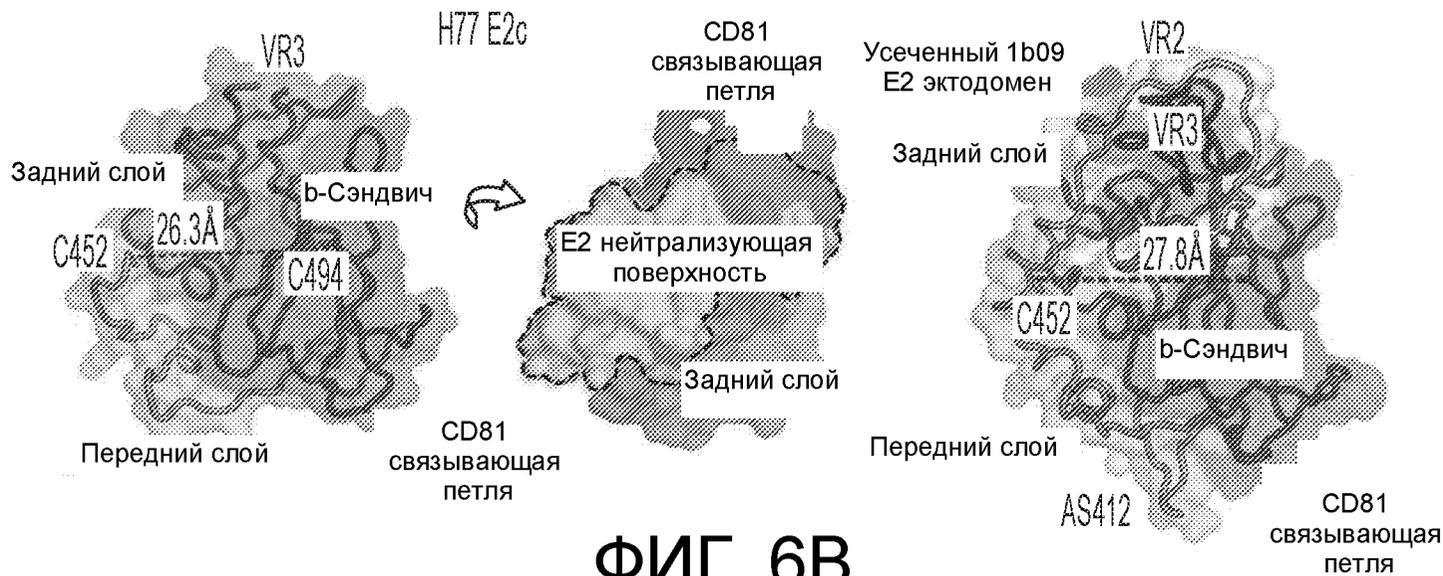


ФИГ. 5G

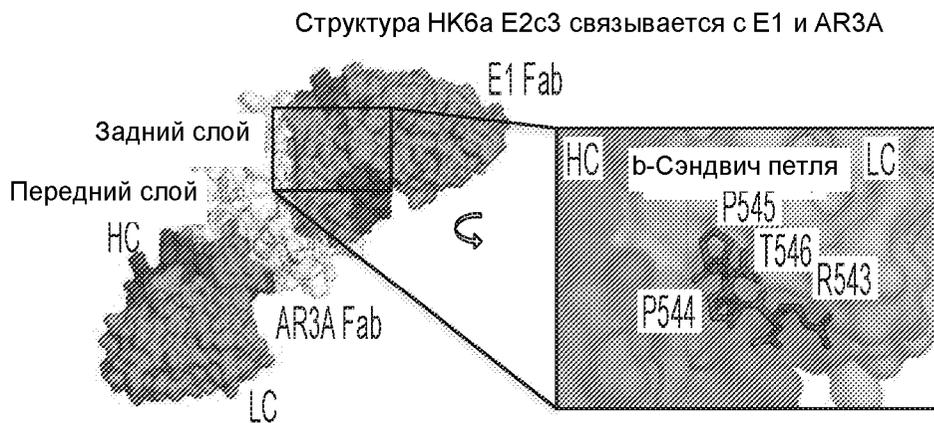


18/60

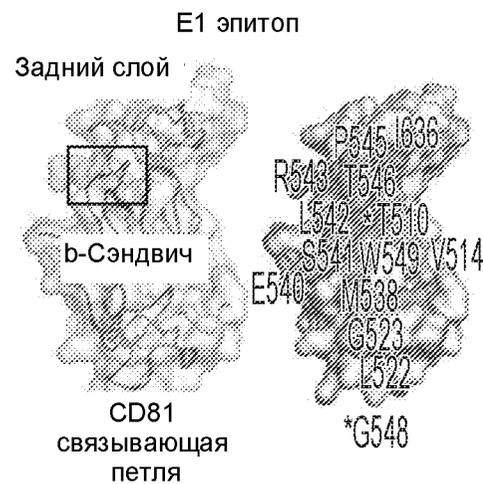
ФИГ. 6А



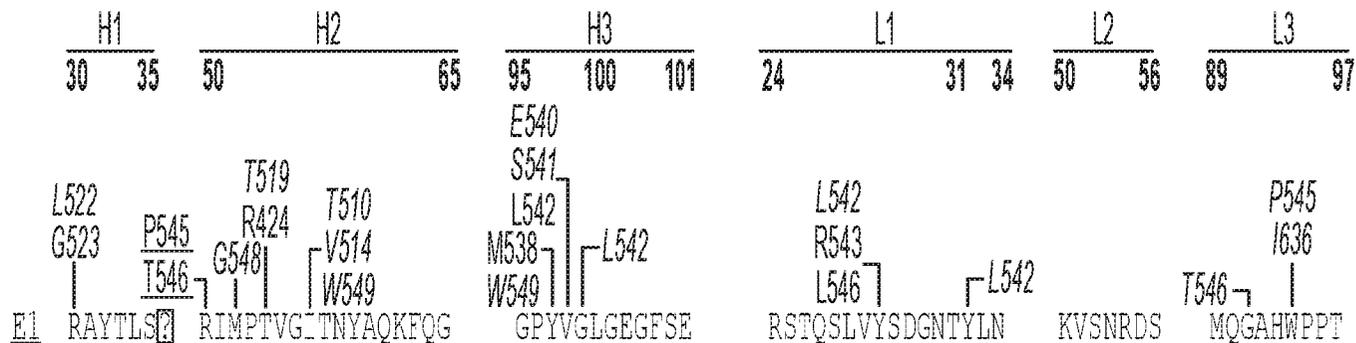
ФИГ. 6B



ФИГ. 6C

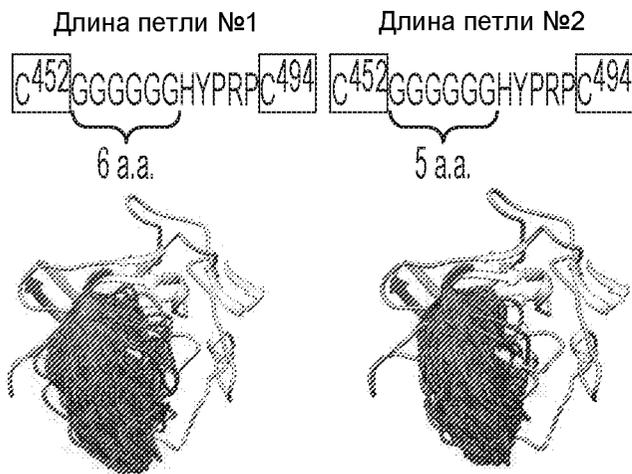


ФИГ. 6D

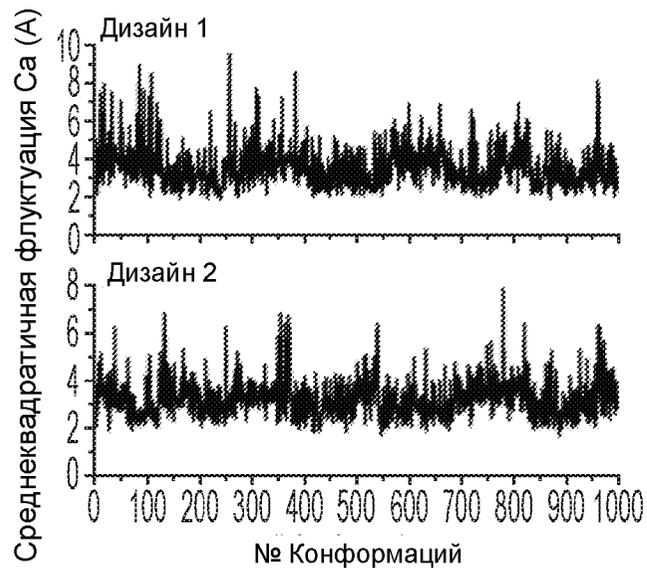


ФИГ. 6Е

Ансамбли E2mc3 tVR2 с измененным дизайном



ФИГ. 6F



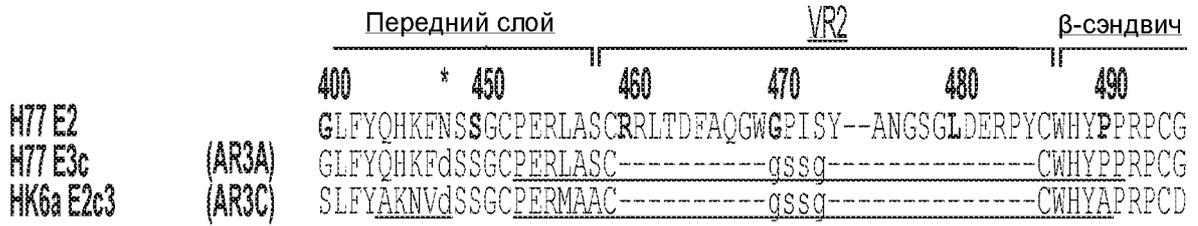
ФИГ. 6G

Замена PERASG посредством C452 PERASG HYPRP C494

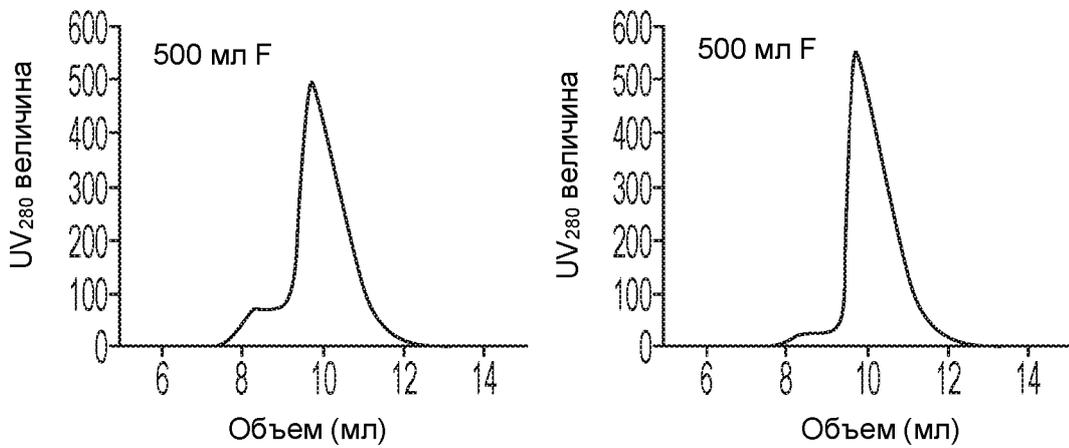
Название	Энергия	Последовательность
v1	-139.205	QNWDEP
v2	-138.005	KVNIDP
v3	-137.772	EKVEEL
v4	-137.611	PDENMK
v5	-137.544	KREEKM
v6	-136.423	PKTEV-
v7	-136.358	KRVDI-
v8	-136.207	PSDMV-
v9	-136.163	PNEEE-
v10	-136.086	KKEIR-

2016/0

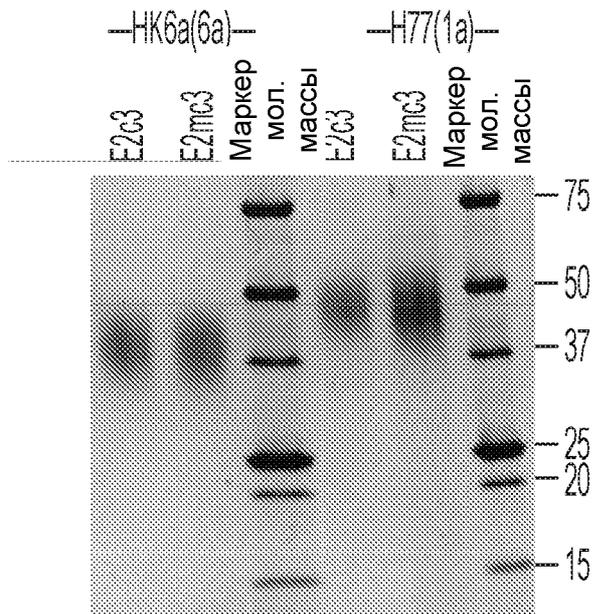
ФИГ. 6H



ФИГ. 6I



ФИГ. 7A



ФИГ. 7B

H77 E2c: эпитопы известных антител

AR3:

AR3C (Law at el. 2008; Kong at el. 2013)

HEPC3 (Bailey at el. 2017)

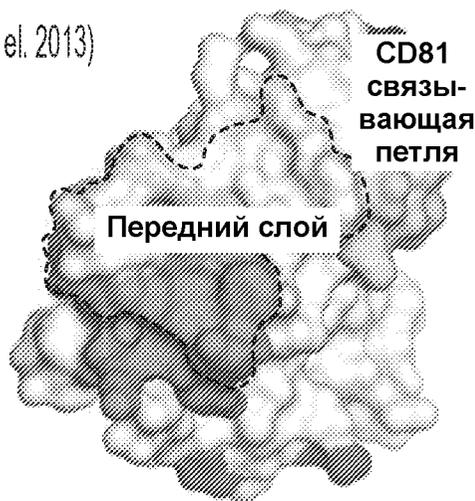
HEPC74 (Bailey at el. 2017)

212.1.1 (Keck at el. 2019)

HC1AM (Keck at el. 2011)

AS434:

HC84.1 (Keck el. 2012)



AS412:

HCV1 (Kong at el. 2012)

HC33.1 (Li at el. 2015)

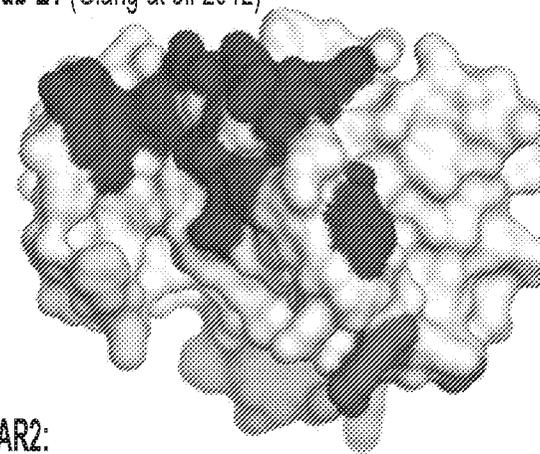


AR1:

AR1A (Law at el. 2008; Gopal at el. 2017)

AR1B (Law at el. 2008; Gopal at el. 2017)

Fab E1 (Giang at el. 2012)

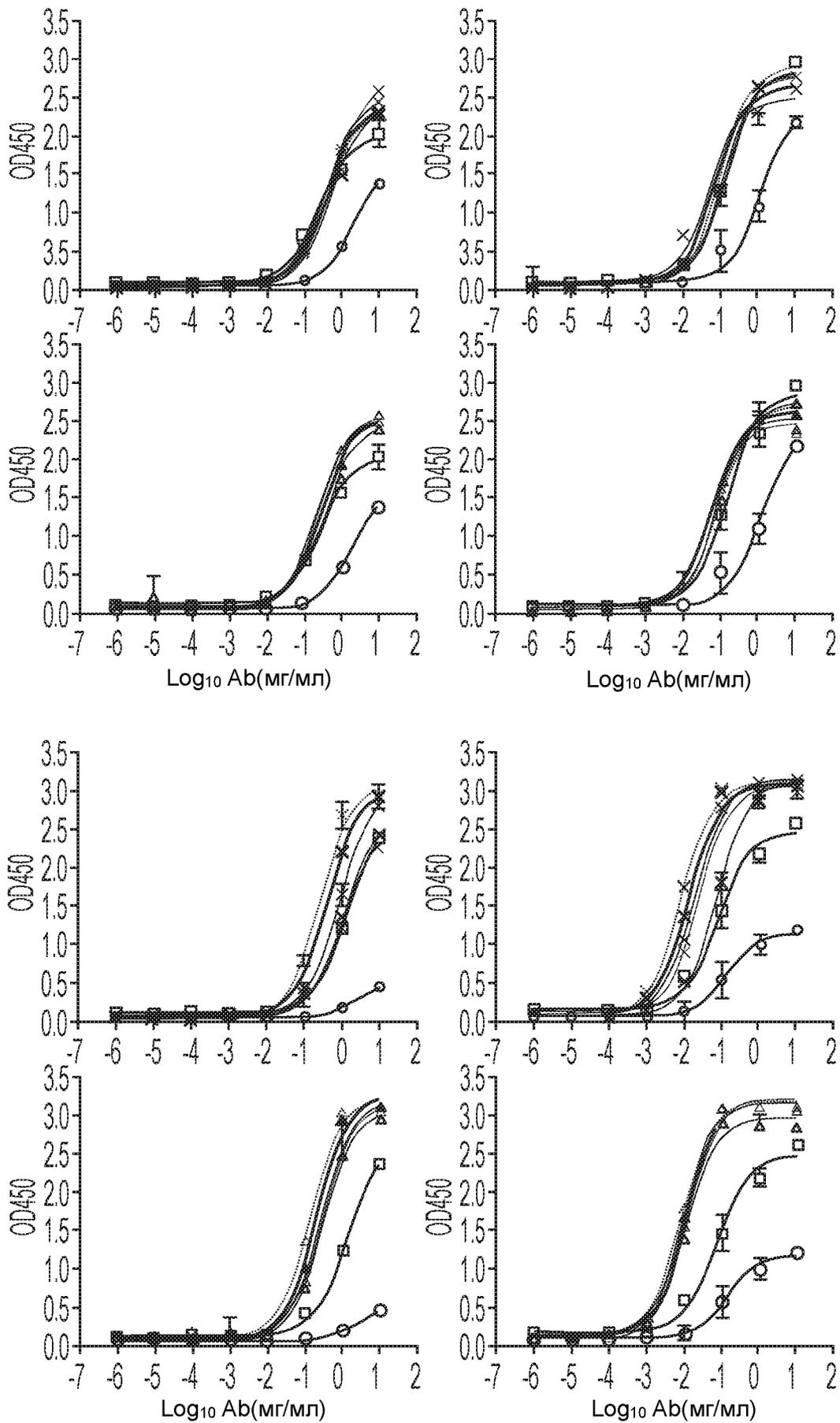


AR2:

AR2A (Law at el. 2008; Gopal at el. 2017)

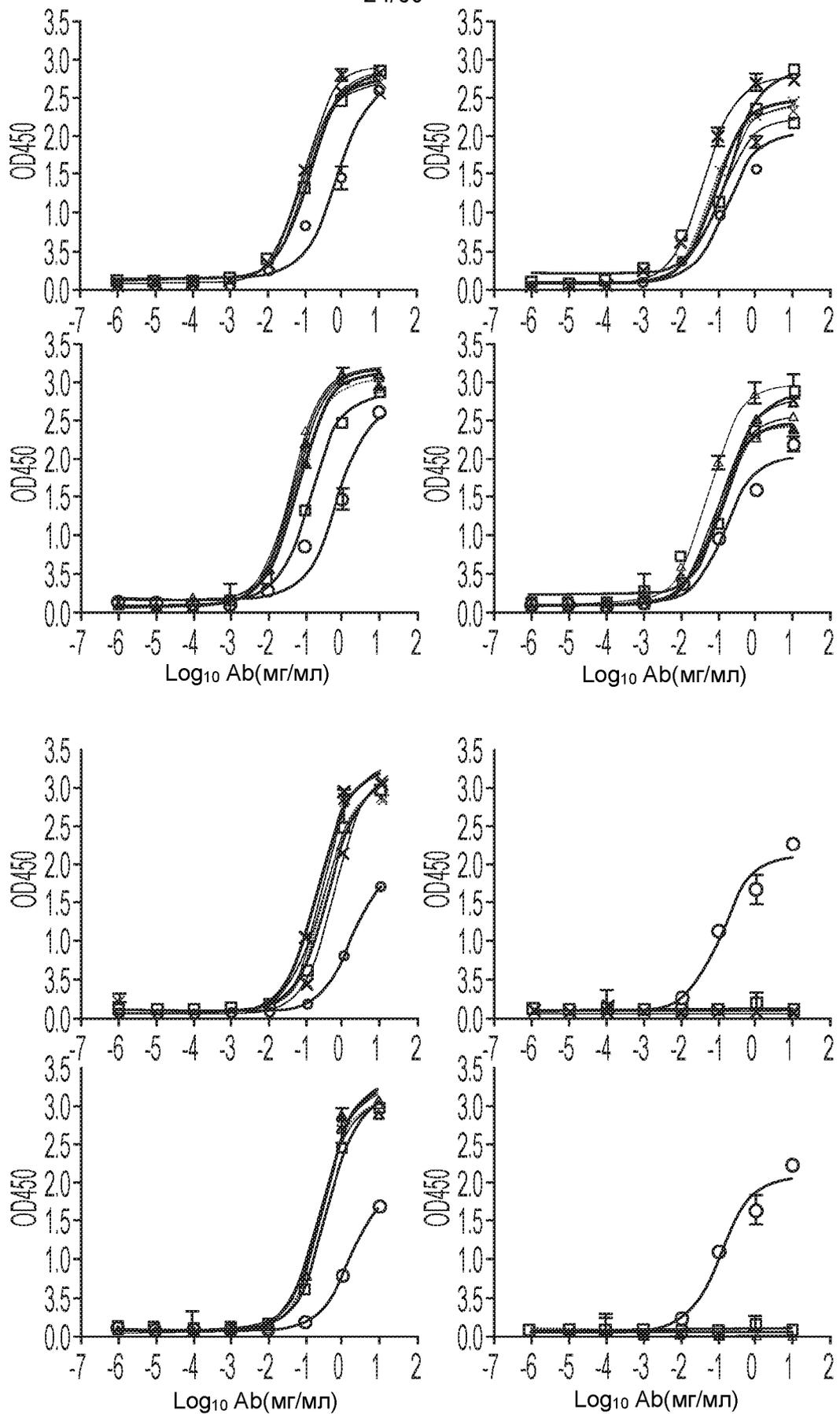
ФИГ. 7С

23/60



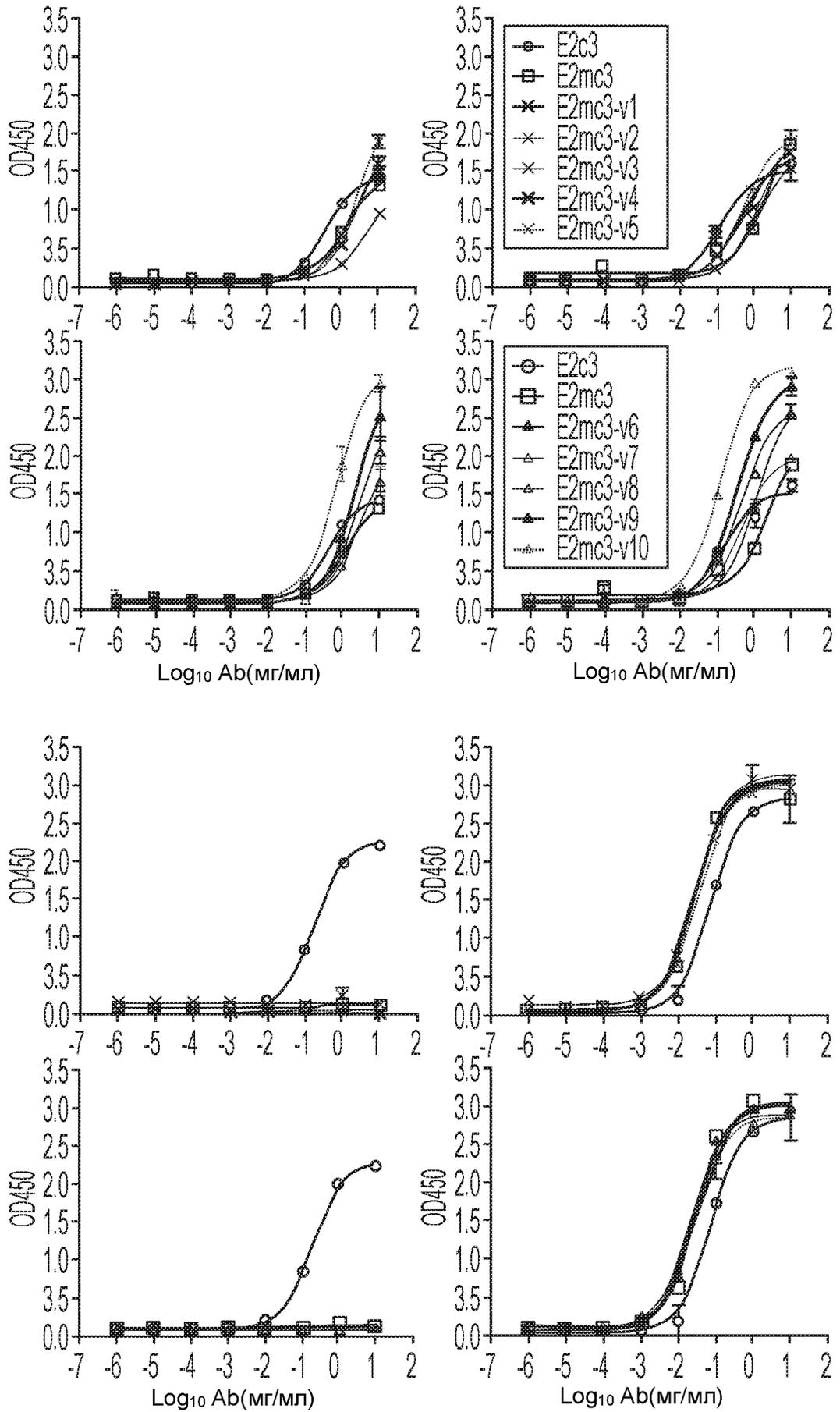
ФИГ. 7D

24/60



ФИГ. 7D (Продолж.)

25/60



ФИГ. 7D (Продолж.)

Значения EC₅₀ конструкций кора E2 H77, связывающихся с 12 антителами, специфичными к HCV^a.

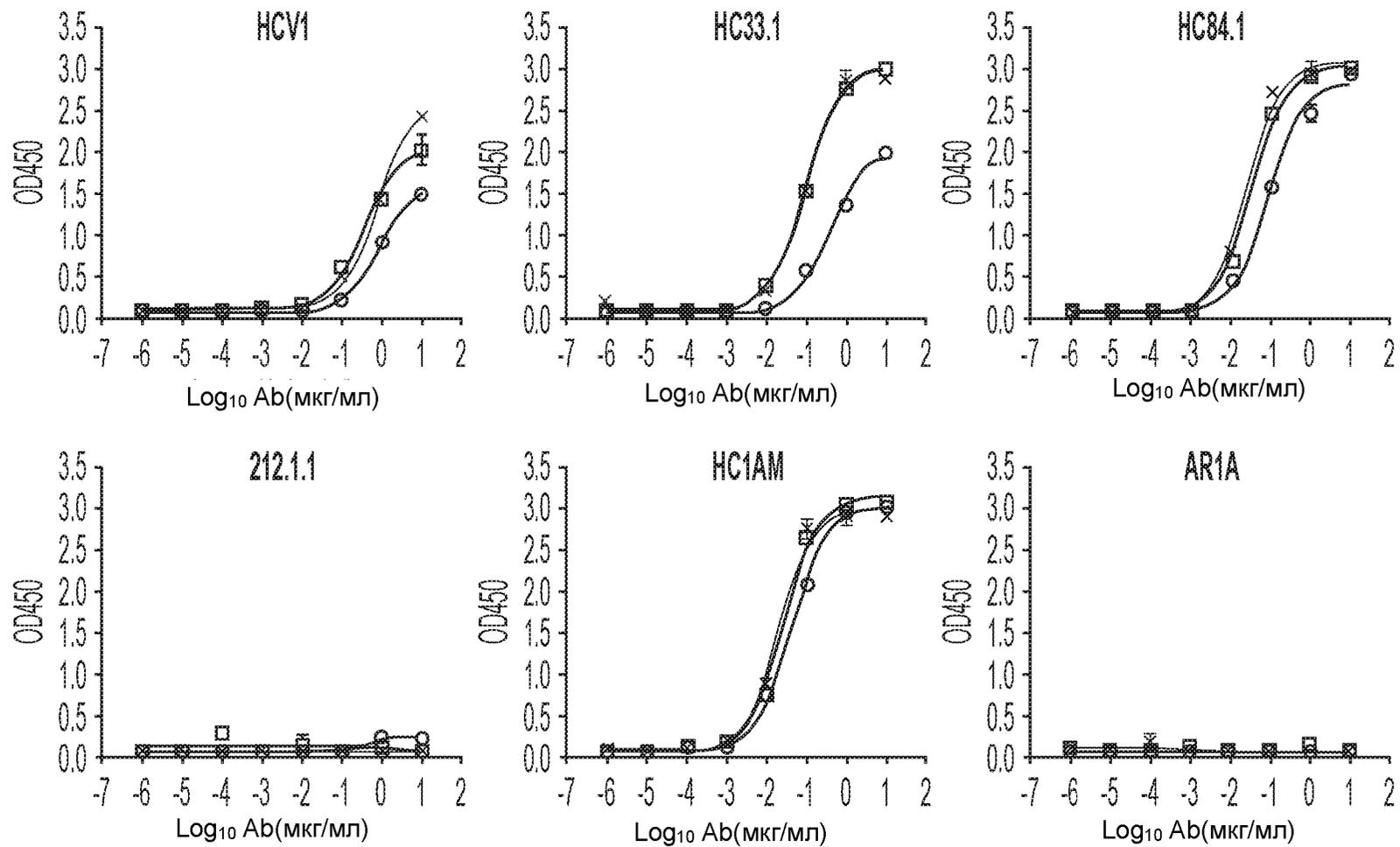
	HCV1	HC33.1	HC84.1	AR3C	HEPC3	HEPC74	212.1.1	HC1AM	AR1A	AR1B	E1	AR2A
E2c3	2.022	1.153	0.6954	0.1458	0.3926	0.1335	2.479	0.1379	1.56	0.1084	0.1799	0.07568
E2mc3	0.2485	0.1481	0.1269	0.17	1.286	2.198	1.215	0.07587	0.3604	-	-	0.02879
E2mc3-v1	0.5451	0.1114	0.08747	0.04025	1.938	0.6034	1.065	0.07059	0.5547	-	-	0.02548
E2mc3-v2	0.5896	0.1219	0.09616	0.09921	2.296	1.395	1.045	0.02245	0.2802	-	-	0.02889
E2mc3-v3	0.3661	0.04867	0.08207	0.09939	4.551	1.427	0.8706	0.02003	0.2646	-	-	0.02851
E2mc3-v4	0.3184	0.06764	0.07956	0.07655	2.637	0.4576	0.4189	0.01254	0.1926	-	-	0.02373
E2mc3-v5	0.4349	0.09598	0.08494	0.05845	2.634	0.5341	0.2482	0.007939	0.3064	-	-	0.03428
E2mc3-v6	0.3588	0.08911	0.04386	0.119	2.864	0.4247	0.2895	0.01092	0.2432	-	-	0.02549
E2mc3-v7	0.2567	0.05072	0.04014	0.05046	2.719	0.4663	0.313	0.01209	0.2532	-	-	0.02785
E2mc3-v8	0.2086	0.05031	0.04738	0.08043	3.186	1.098	0.2663	0.009017	0.2487	-	-	0.0201
E2mc3-v9	0.3242	0.05871	0.05566	0.08429	2.568	0.3426	0.1992	0.01026	0.2615	-	-	0.02962
E2mc3-v10	0.2225	0.09384	0.04887	0.08056	0.7269	0.1174	0.1355	0.007812	0.2874	-	-	0.0284

^aЗначения EC₅₀ были рассчитаны на основе наилучшего подбора в GraphPad Prism 6.

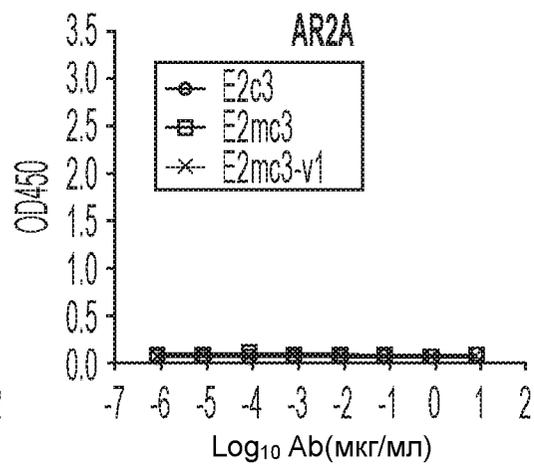
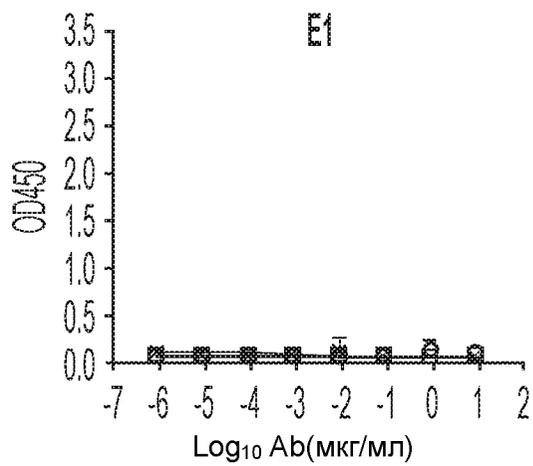
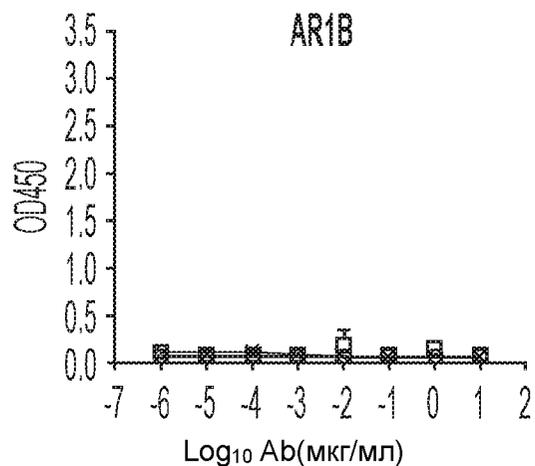
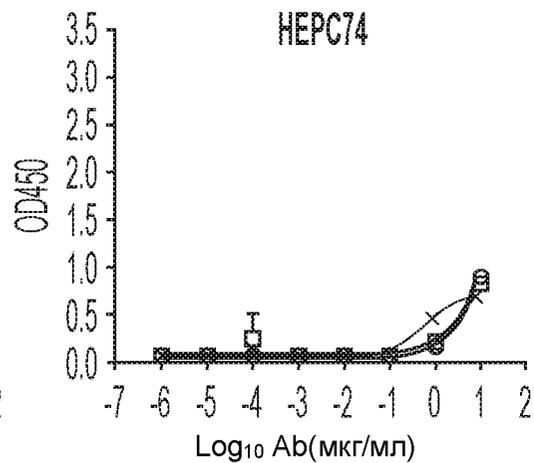
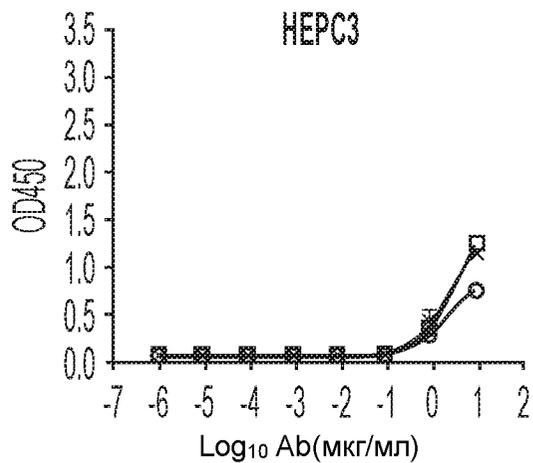
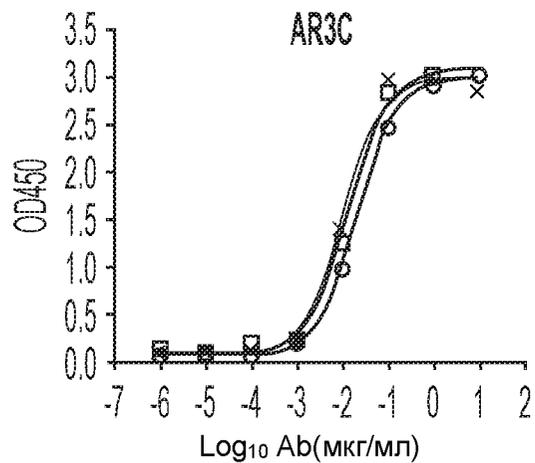
26/60

ФИГ. 7E

Антигенетическое профилирование дизайнов НК6а E2с3 против E2с3 с помощью ELISA



ФИГ. 7F



ФИГ. 7F (Продолж.)

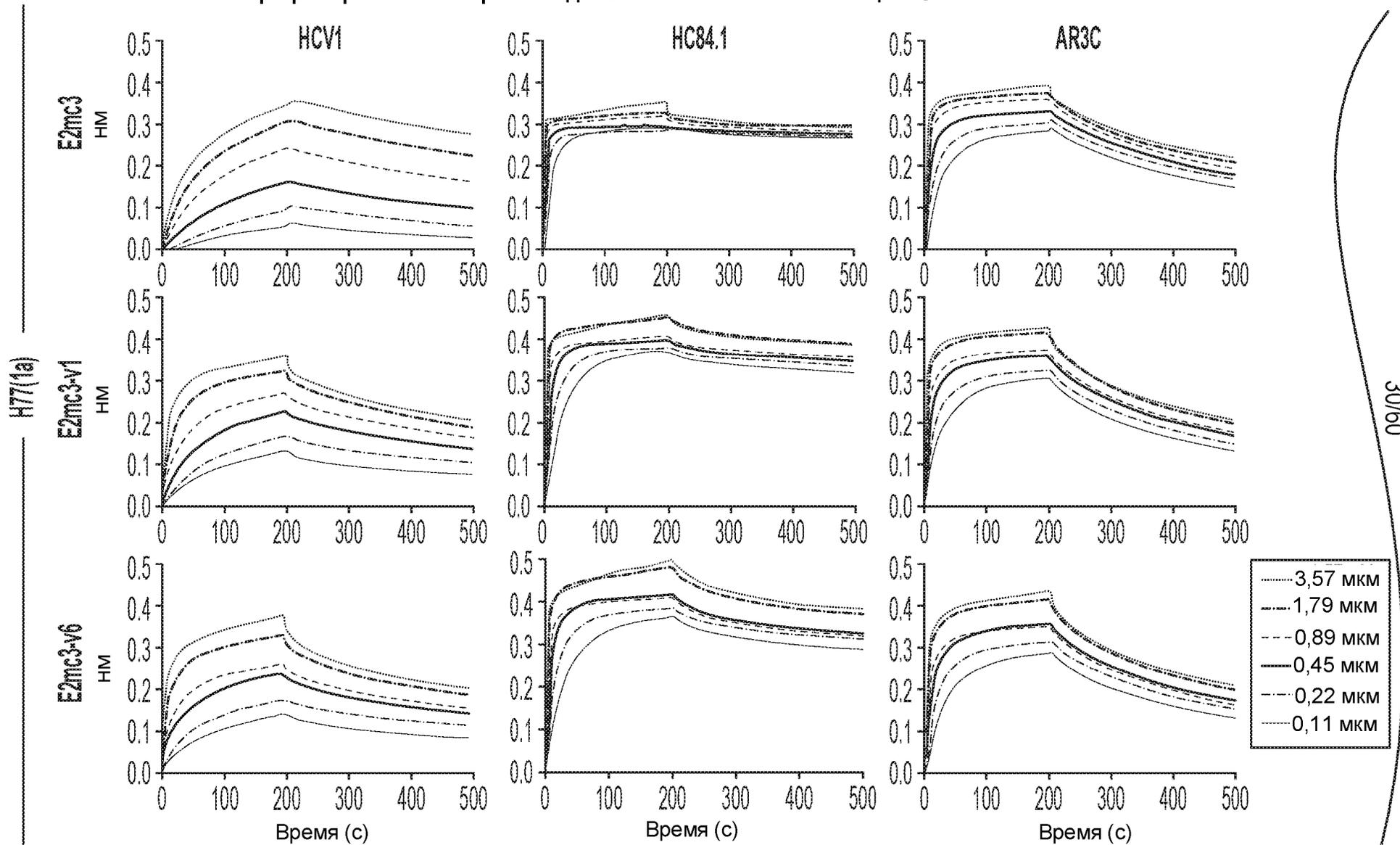
Значения EC₅₀ конструкций кора E2 НК6а, связывающихся с 12 антителами, специфичными к HCV^a.

	HCV1	HC33.1	HC84.1	AR3C	HEPC3	HEPC74	212.1.1	HC1AM	AR1A	AR1B	E1	AR2A
E2c3	0.8293	0.4099	0.08365	0.02219	2.637	15.88	-	0.0418	-	-	-	-
E2mc3	0.3883	0.1034	0.03069	0.01498	4.767	12.29	-	0.02714	-	-	-	-
E2mc3-v1	0.7244	0.1054	0.02383	0.01109	2.938	0.771	-	0.02011	-	-	-	-

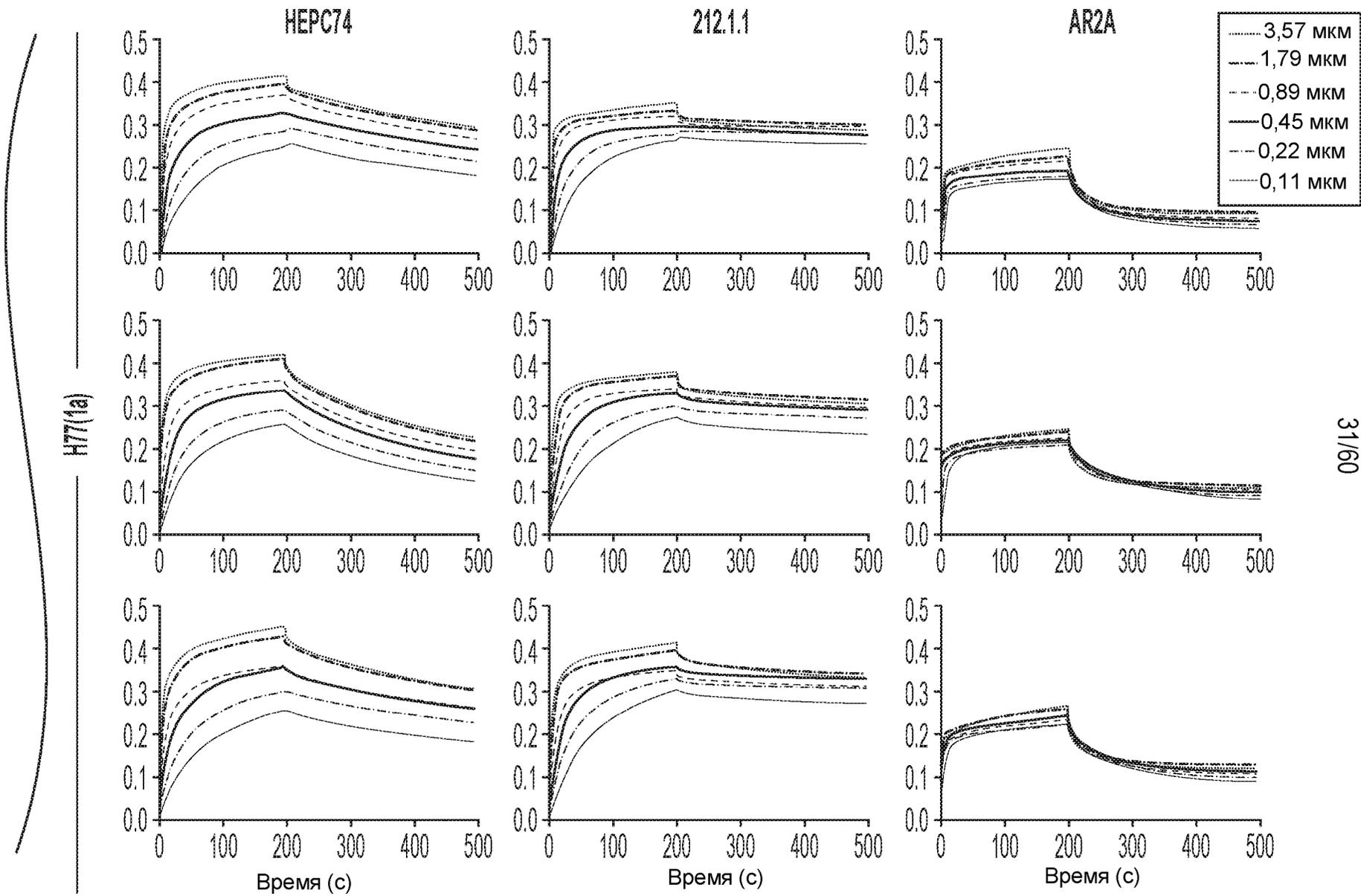
^aЗначения EC₅₀ были рассчитаны на основе наилучшего подбора в Prism.

ФИГ. 7G

Антигенетическое профилирование выбранных дизайнов H77 E2mc3 с помощью Octet

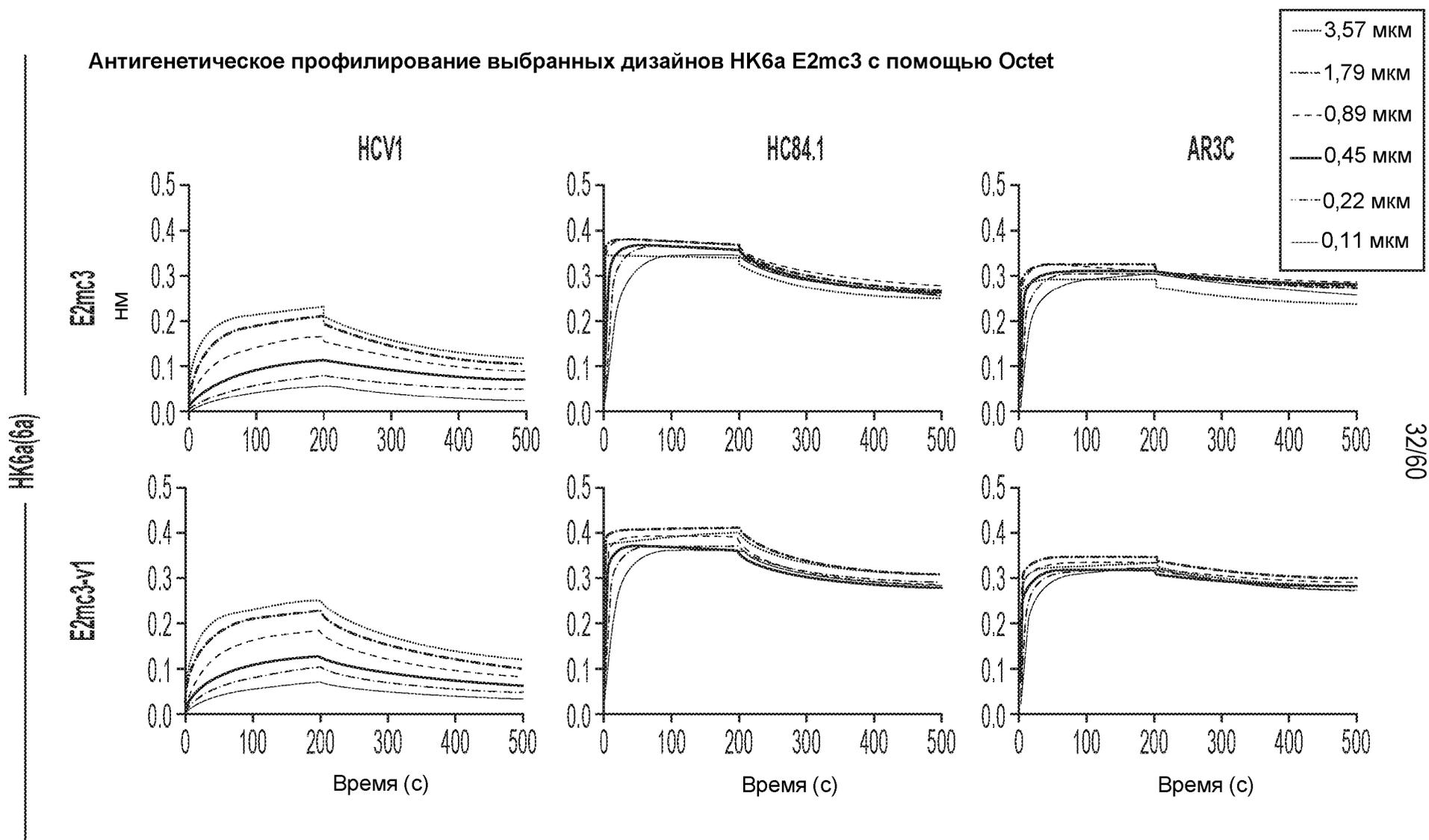


ФИГ. 7H

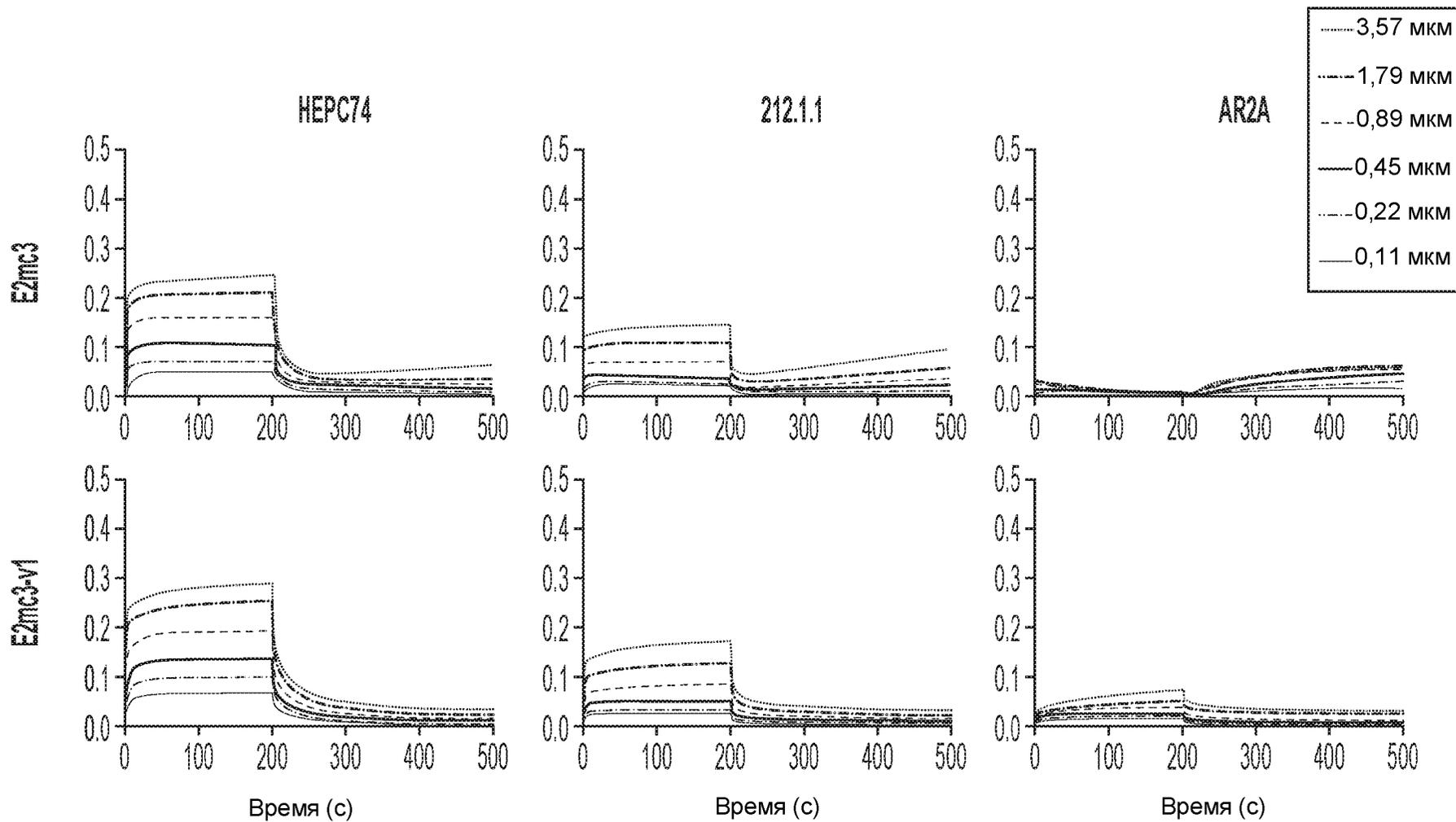


ФИГ. 7Н (Продолж.)

Антигенетическое профилирование выбранных дизайнов НК6а E2мс3 с помощью Octet



ФИГ. 71

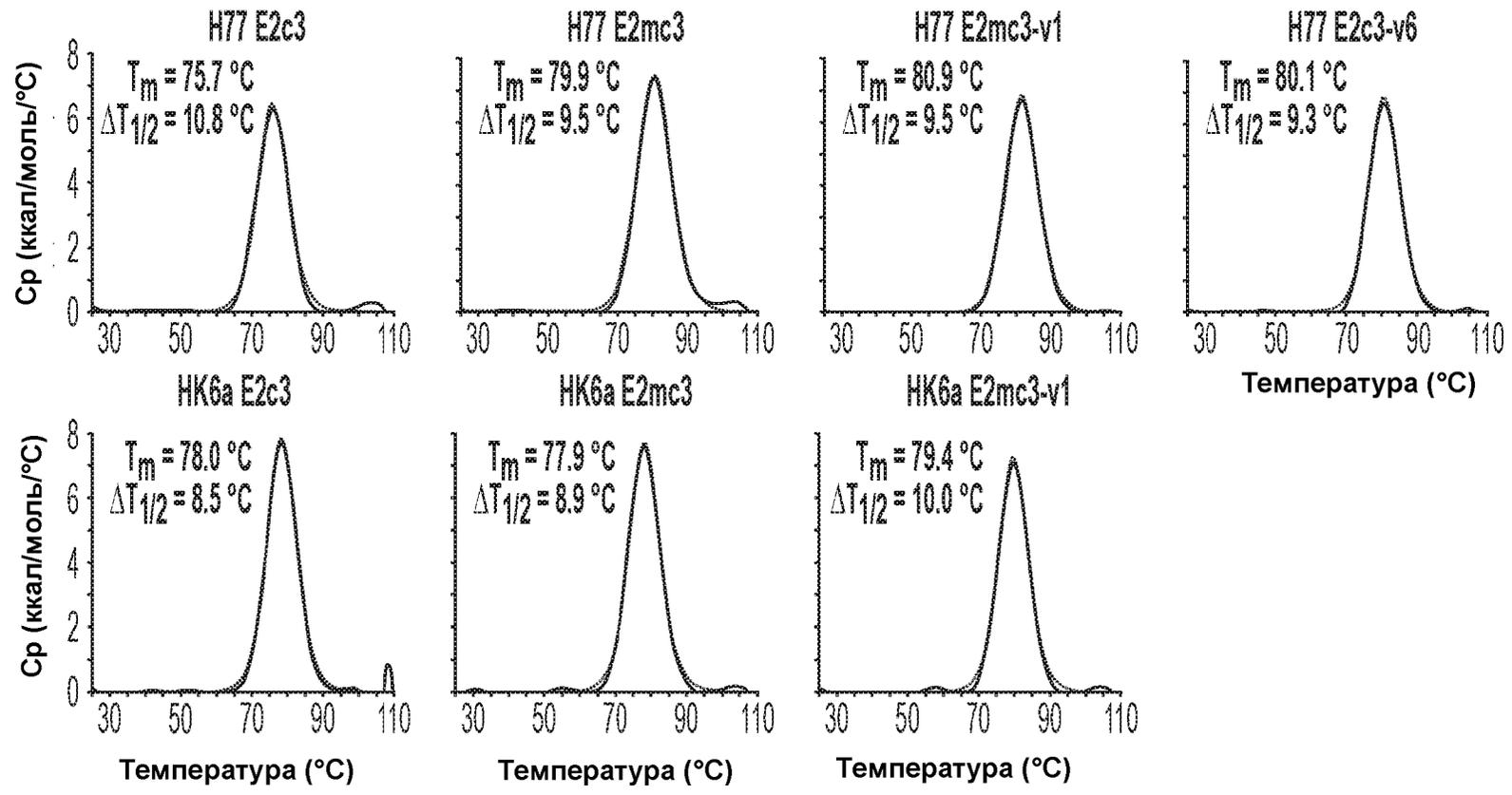


ФИГ. 71 (Продолж.)

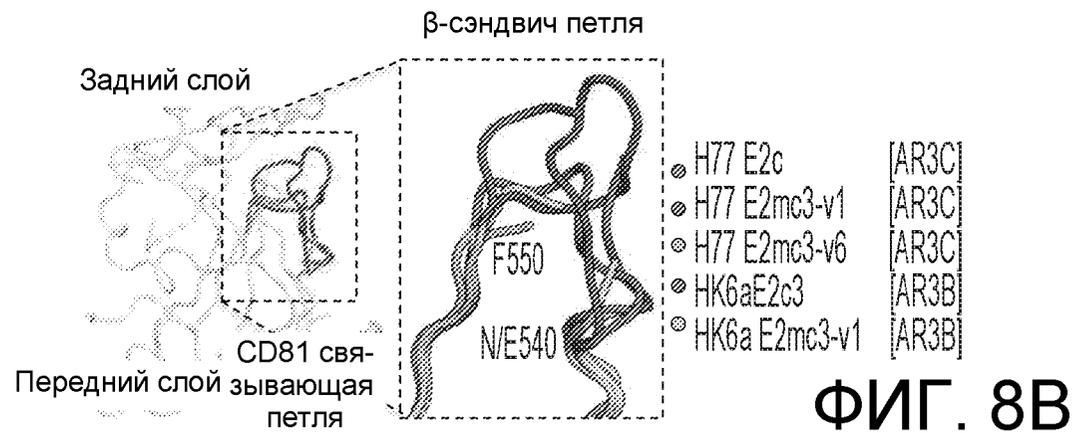
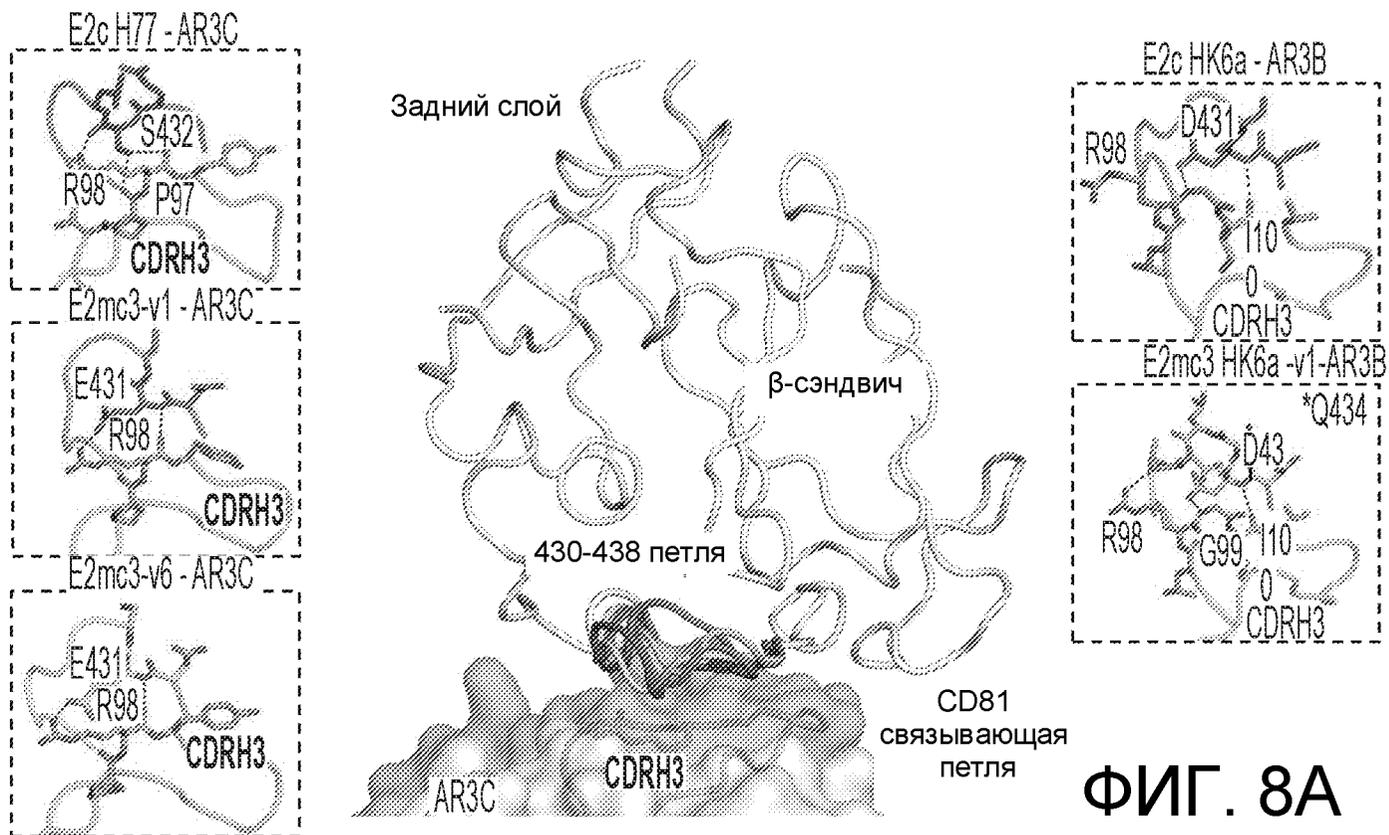
Значения K_D вариантов E2mc3, связывающихся с шестью репрезентативными специфическими антителами к HCV, измеренные с помощью Octet^a.

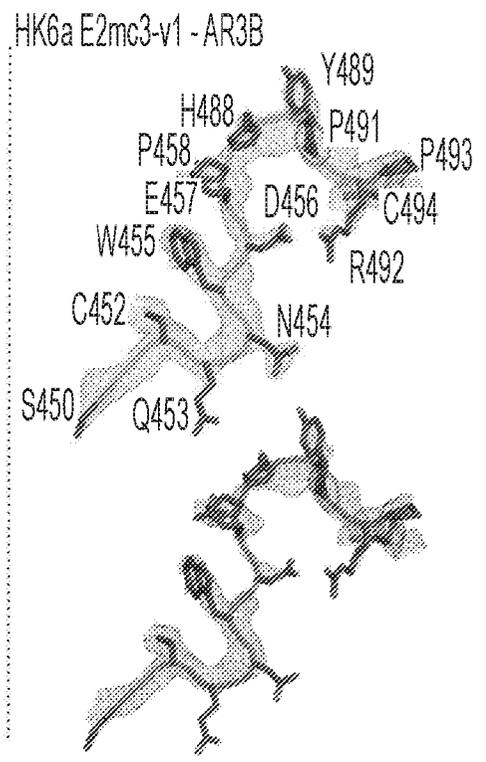
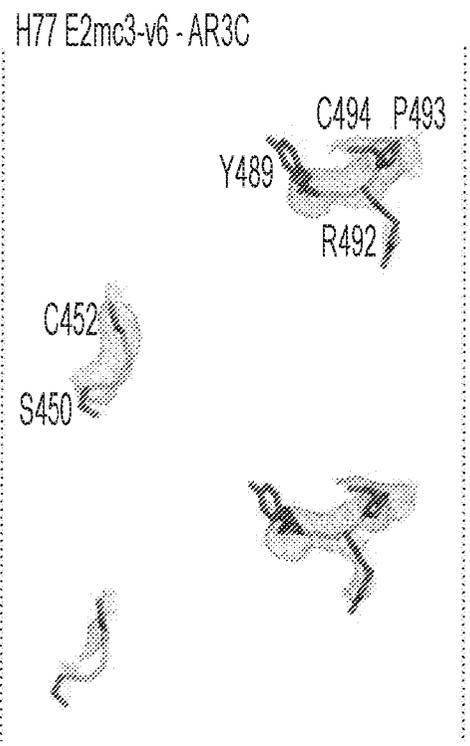
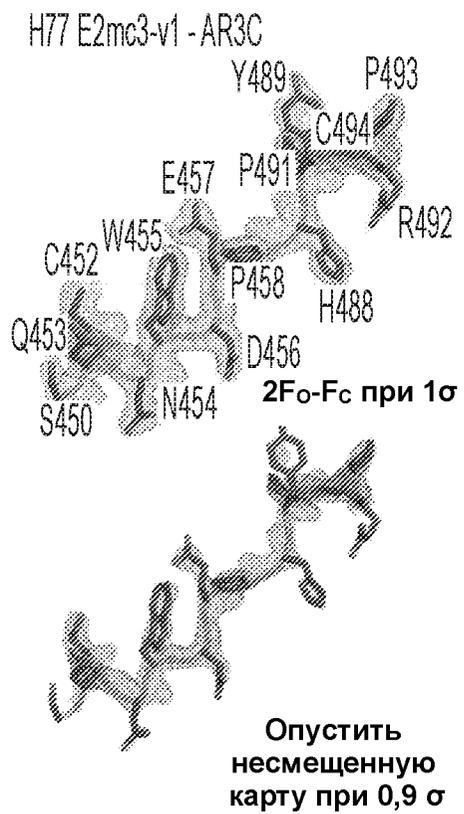
		HCV1		HC84.1		AR3C		HEPC74		212.1.1		AR2A	
		Ave[6]	Ave[3]										
H77	E2mc3	5.96E-07	6.21E-07	1.00E-09	1.45E-09	1.20E-08	1.26E-08	1.26E-08	1.20E-08	2.27E-09	3.04E-09	9.74E-09	6.61E-09
	E2mc3-v1	5.19E-08	5.16E-08	2.24E-09	2.37E-09	1.73E-08	1.93E-08	2.55E-08	2.72E-08	5.28E-09	6.06E-09	8.76E-09	6.17E-09
	E2mc3-v6	4.60E-08	4.83E-08	4.97E-09	4.91E-09	1.95E-08	2.23E-08	1.84E-08	2.21E-08	4.27E-09	5.24E-09	9.47E-09	5.92E-09
HK6a	E2mc3	6.99E-08	7.10E-08	2.85E-09	2.98E-09	1.67E-09	2.06E-09	1.19E-07	1.29E-07	1.16E-08	6.11E-09	—	—
	E2mc3-v1	8.75E-08	8.38E-08	2.68E-09	2.61E-09	1.60E-09	1.98E-09	1.20E-07	1.26E-07	5.78E-08	8.28E-08	5.18E-08	2.62E-08

ФИГ. 7J

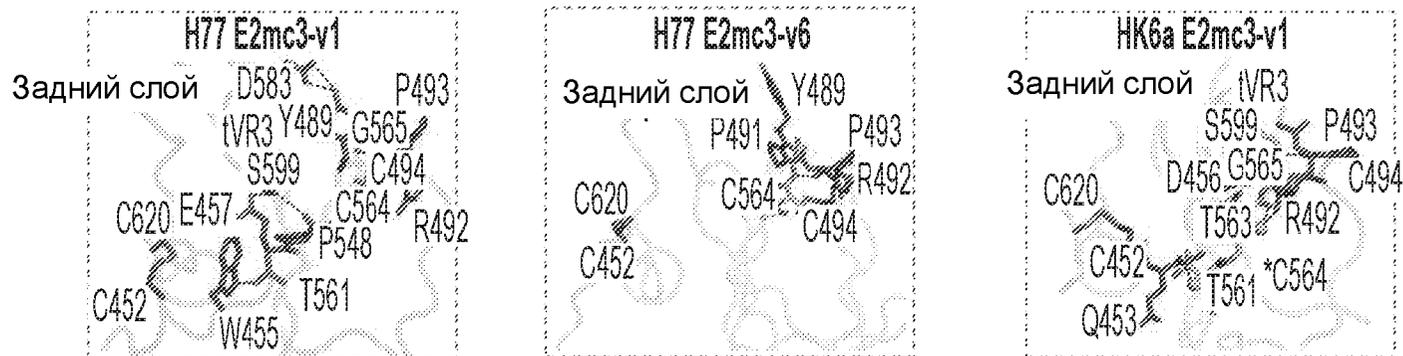


ФИГ. 7К

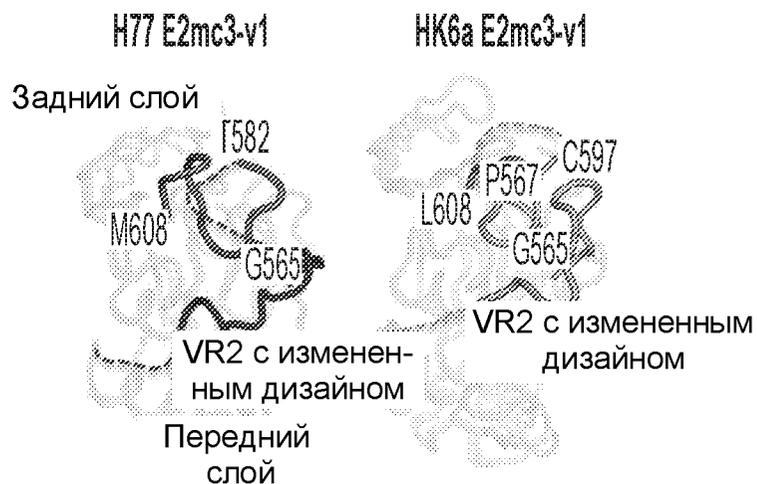




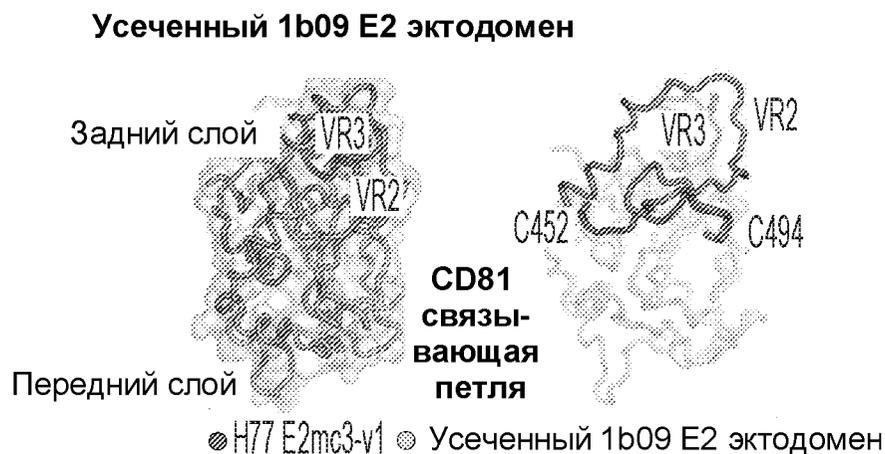
ФИГ. 9А



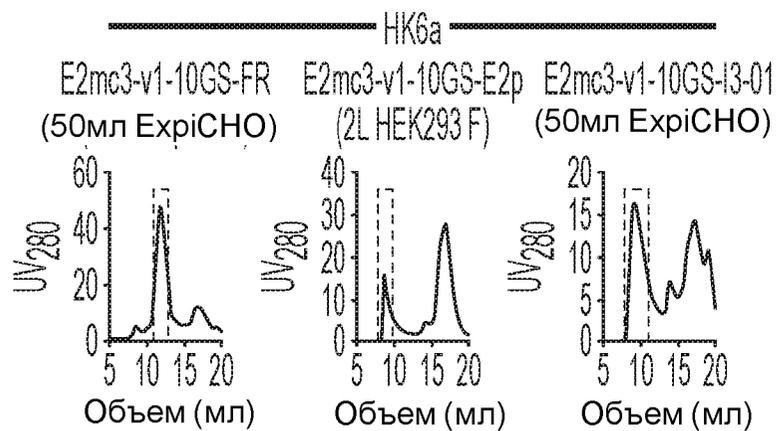
ФИГ. 9B



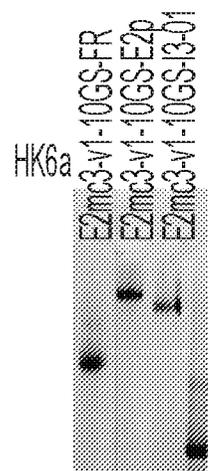
ФИГ. 9C



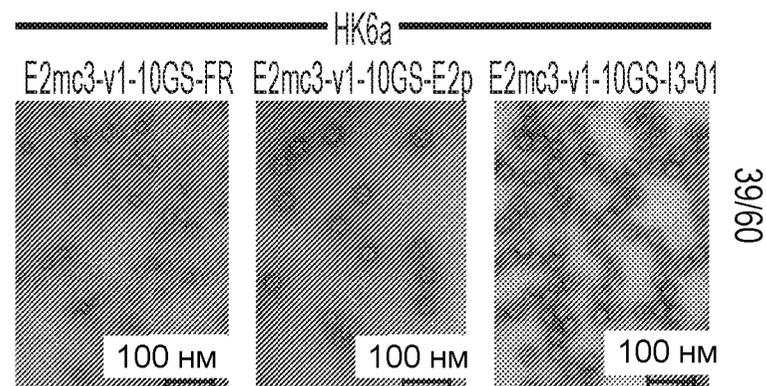
ФИГ. 9D



ФИГ. 10А

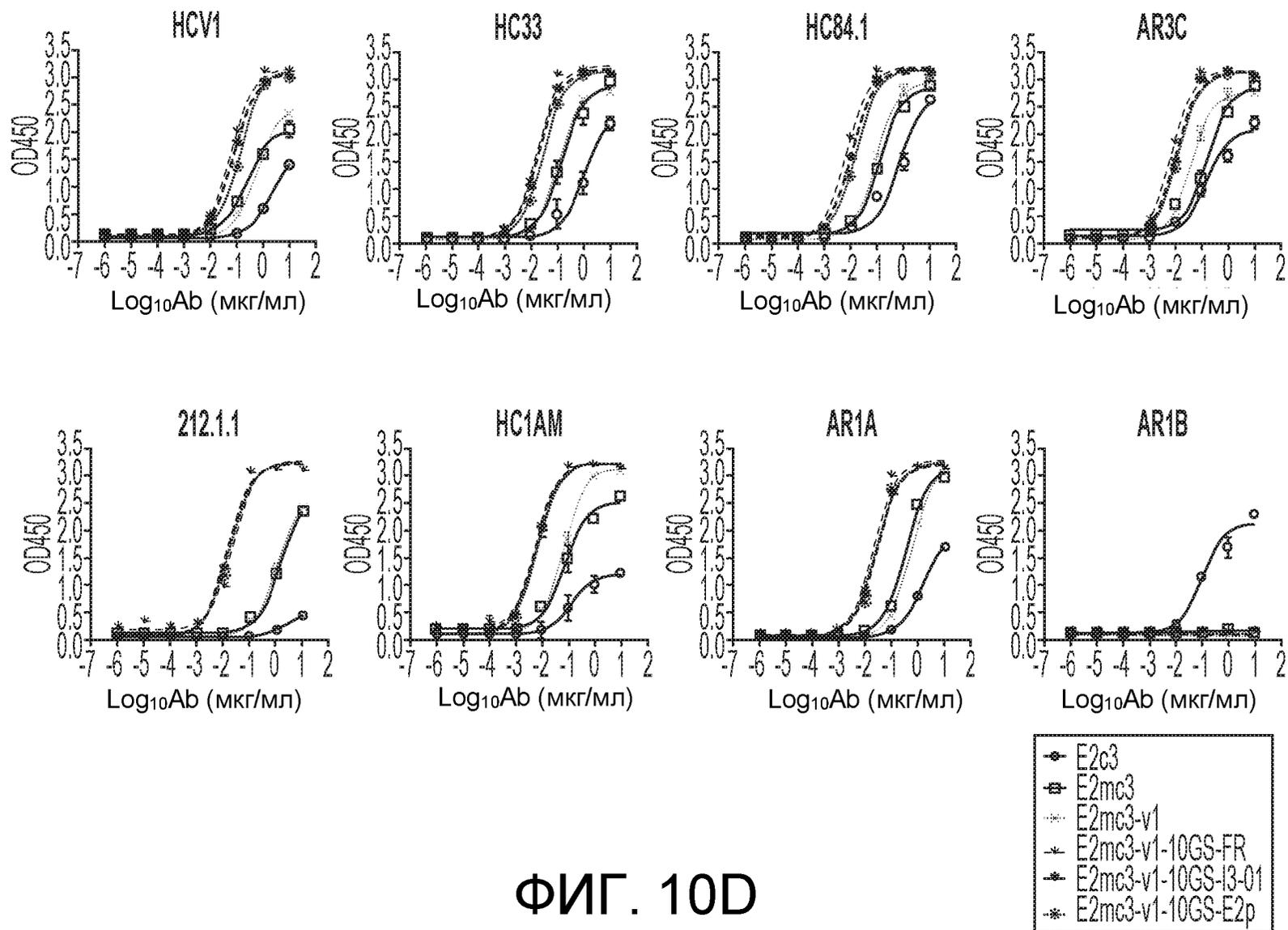


ФИГ. 10В



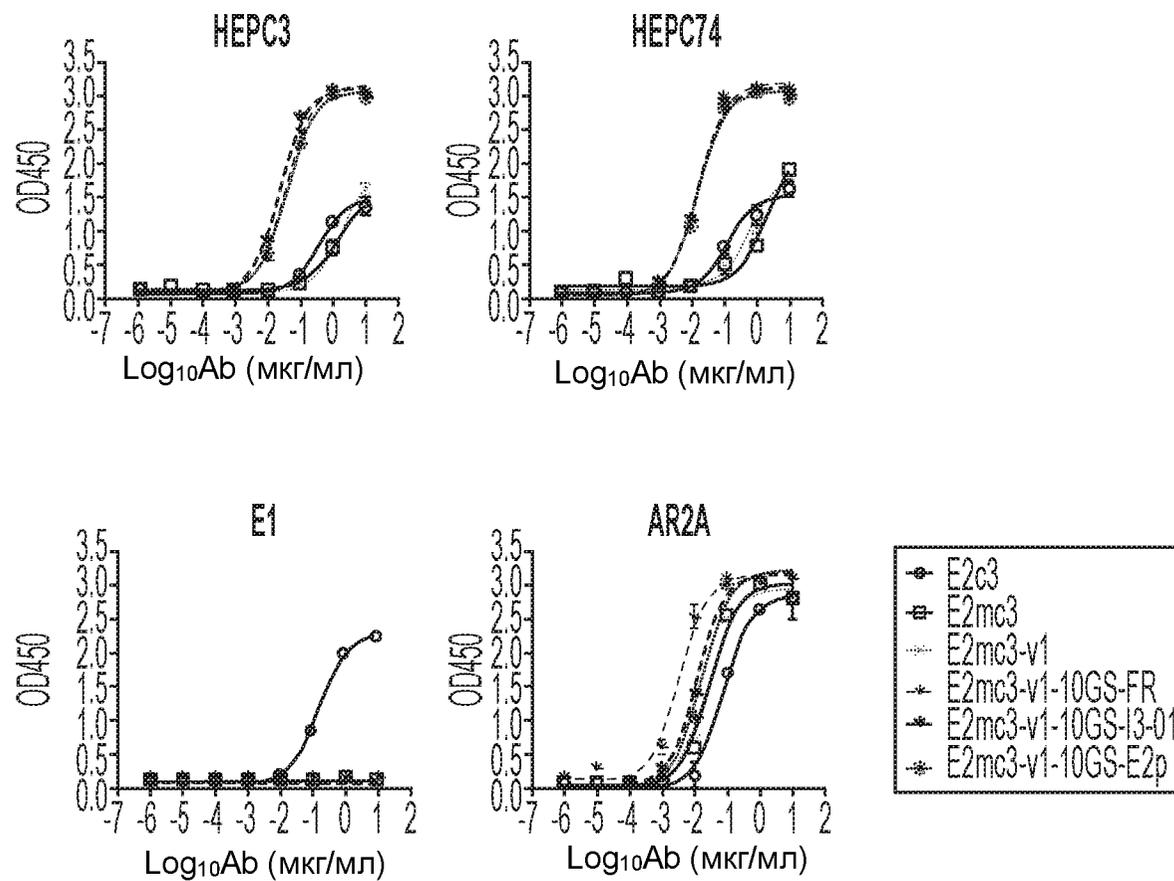
ФИГ. 10С

Антигенетическое профилирование наночастиц с кором E2 H77



40/60

ФИГ. 10D



ФИГ. 10D (Продолж.)

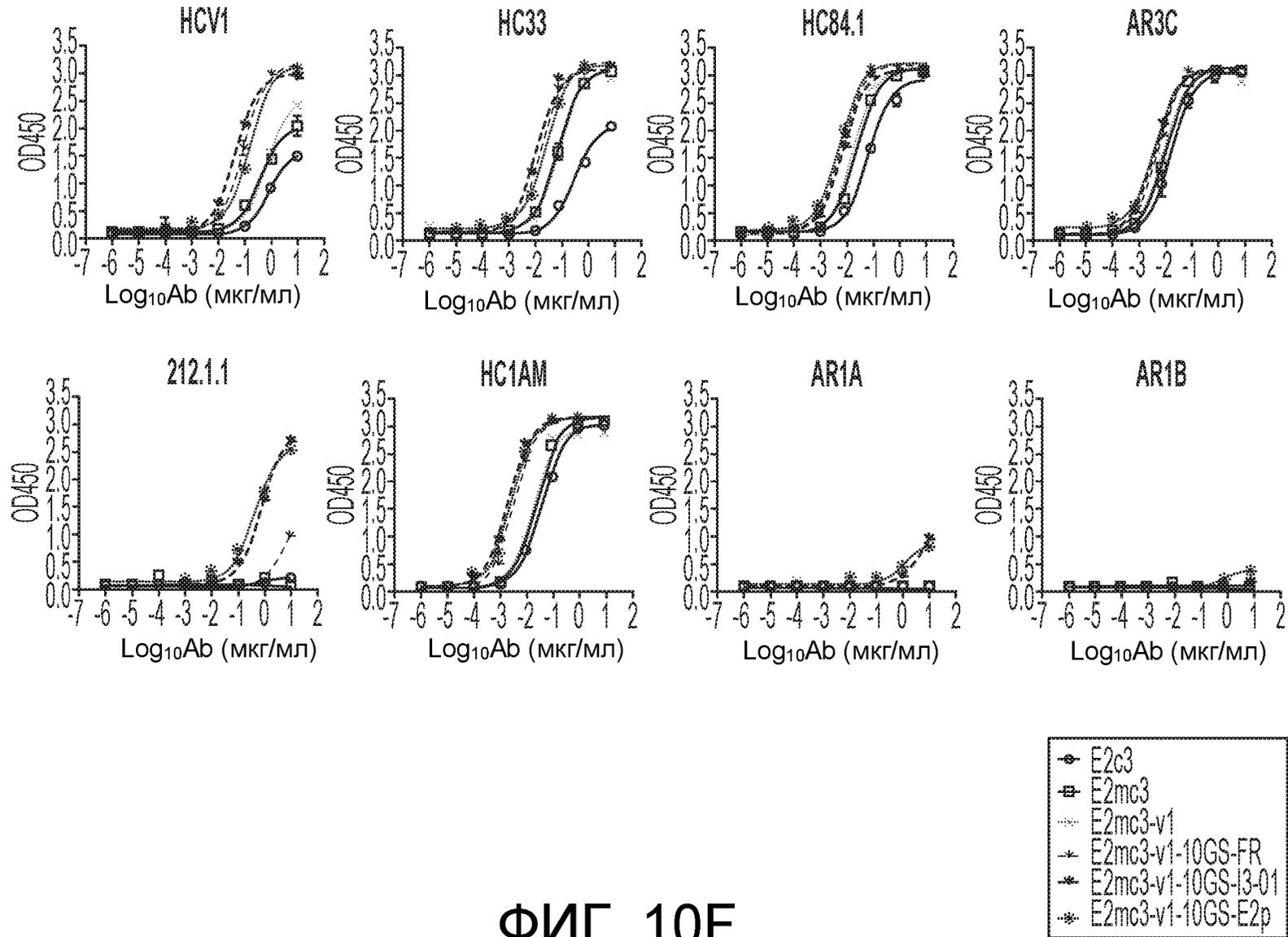
Значения EC₅₀ различных наночастиц с кором E2 H77, связывающихся с 12 антителами, специфичными к HCV^a.

	HCV1	HC33	HC84.1	AR3C	HEPC3	HEPC74	212.1.1	HC1AM	AR1A	AR1B	E1	AR2A
E2c3	2.022	1.153	0.6954	0.1458	0.3926	0.1335	2.479	0.1379	1.56	0.1084	0.1799	0.07568
E2mc3	0.2485	0.1481	0.1269	0.17	1.286	2.198	1.215	0.07587	0.3604	-	-	0.02879
E2mc3-v1	0.5451	0.1114	0.08747	0.04025	1.938	0.6034	1.065	0.07059	0.5547	-	-	0.02548
v1-10GS-FR	0.05775	0.01682	0.007175	0.007275	0.03598	0.01634	0.02125	0.007	0.0214	-	-	0.003544
v1-10GS-E2p	0.1301	0.0311	0.01563	0.01266	0.03929	0.01786	0.01591	0.006578	0.02986	-	-	0.01755
v1-10GS-I3-01	0.07697	0.01976	0.01088	0.01108	0.02433	0.01551	0.01348	0.005776	0.02758	-	-	0.01209

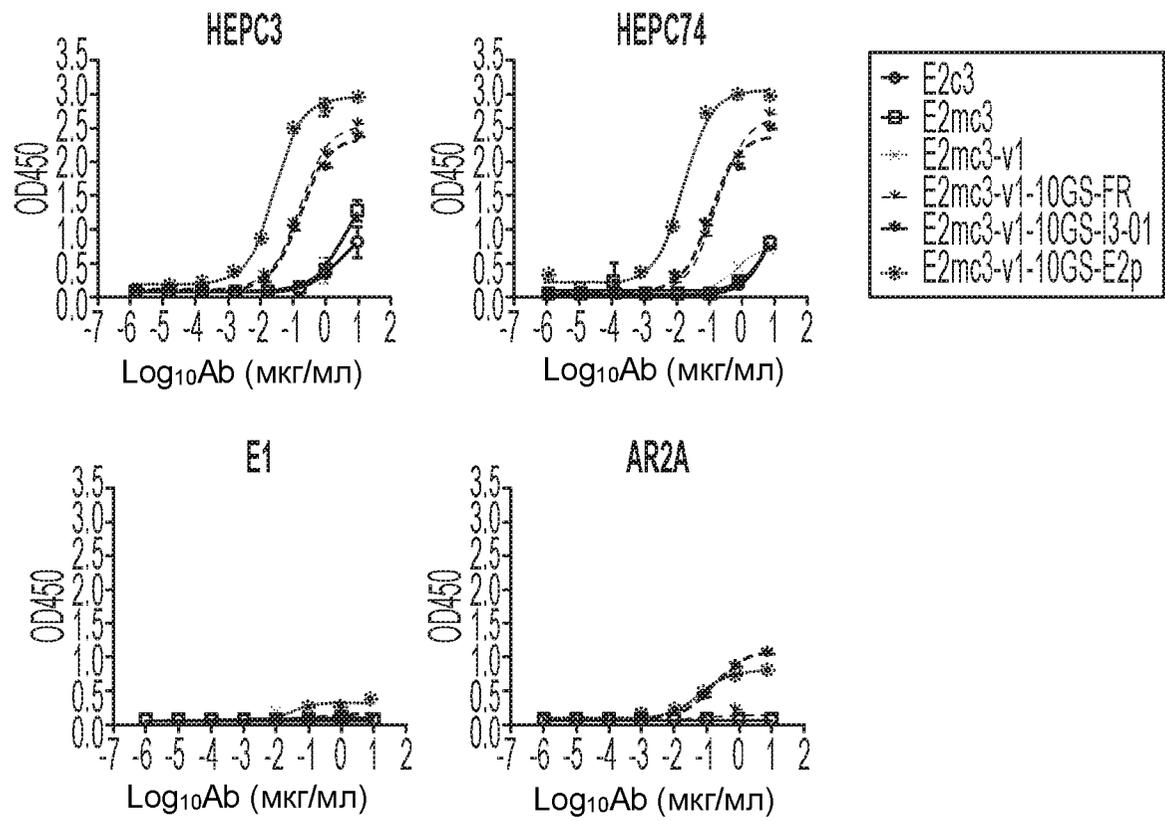
^aЗначения EC₅₀ были рассчитаны на основе наилучшего подбора в Prism.

ФИГ. 10E

Антигенетическое профилирование наночастиц с кором E2 НК6а



ФИГ. 10F



ФИГ. 10F (Продолж.)

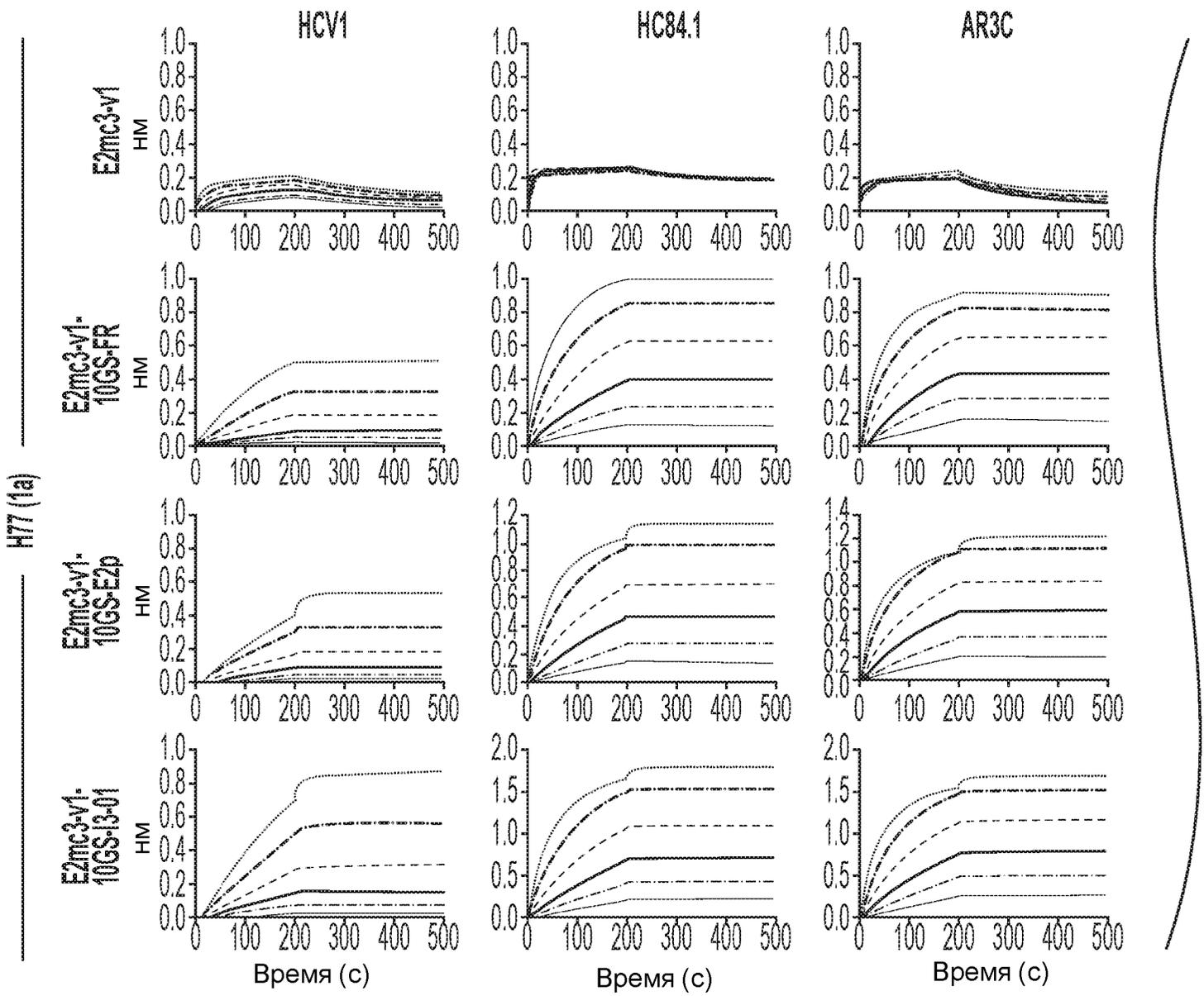
Значения EC₅₀ различных наночастиц с кором E2 НК6а, связывающихся с 12 антителами, специфичными к HCV^a.

	HCV1	HC33	HC84.1	AR3C	HEPC3	HEPC74	212.1.1	HC1AM	AR1A	AR1B	E1	AR2A
E2c3	0.8293	0.4099	0.08365	0.02219	2.637	15.88	-	0.0418	-	-	-	-
E2mc3	0.3883	0.1034	0.03069	0.01498	4.767	12.29	-	0.02714	-	-	-	-
E2mc3-v1	0.7244	0.1054	0.02383	0.01109	2.938	0.771	-	0.02011	-	-	-	-
v1-10GS-FR	0.0923	0.02377	0.007617	0.007139	0.1703	0.2297	6.501	0.003927	-	-	-	-
v1-10GS-E2p	0.1586	0.03368	0.006394	0.005718	0.02632	0.0206	0.4494	0.003214	1.405	-	-	0.07849
v1-10GS-I3-01	0.04669	0.01564	0.008569	0.005155	0.1617	0.1534	0.7927	0.002361	6.271	-	-	0.1968

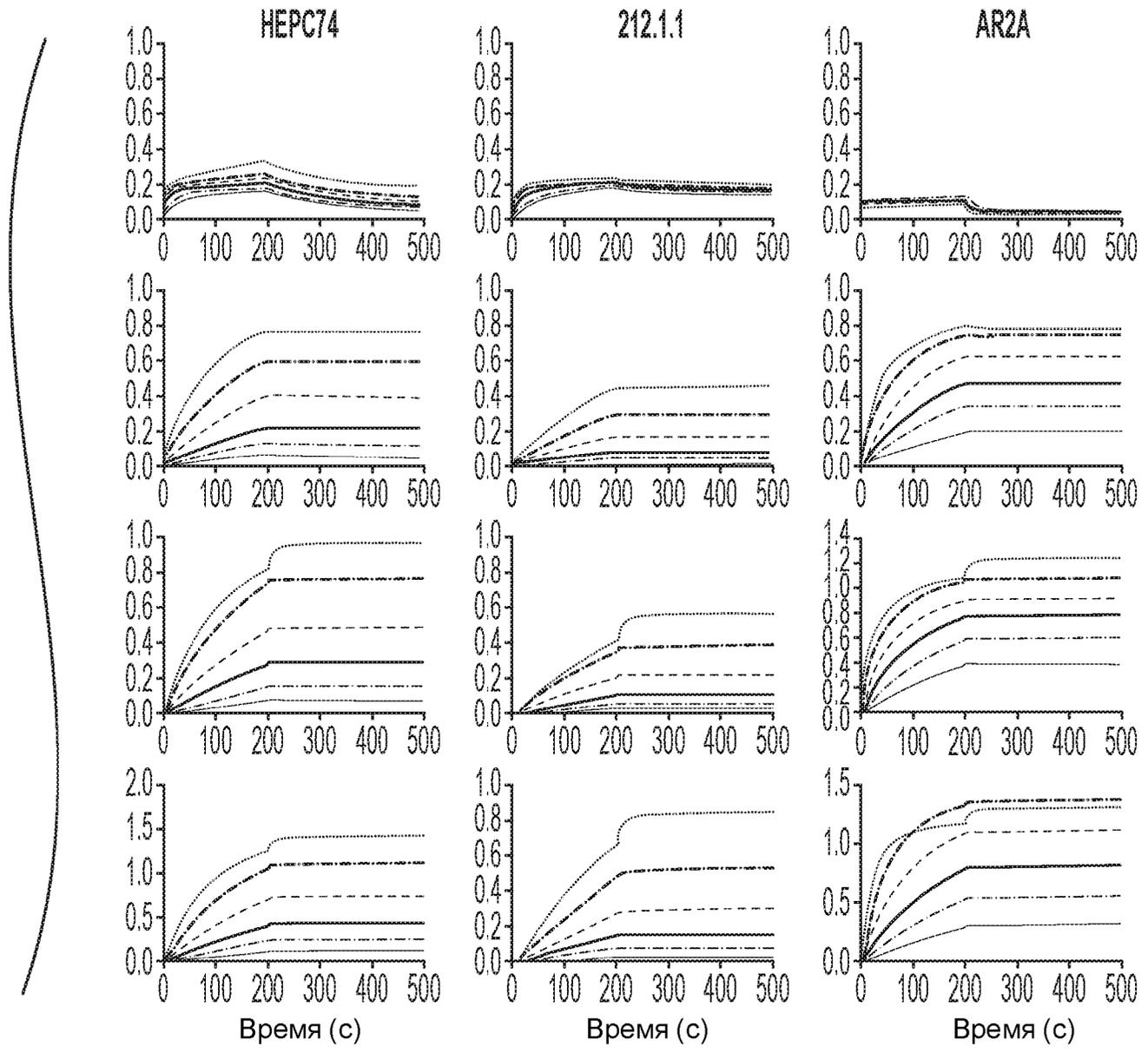
45/60

^aЗначения EC₅₀ были рассчитаны на основе наилучшего подбора в Prism.

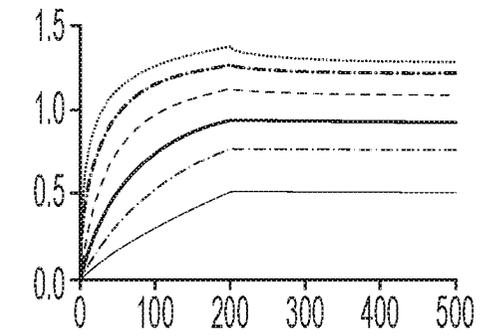
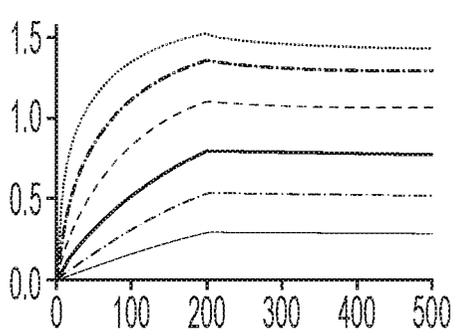
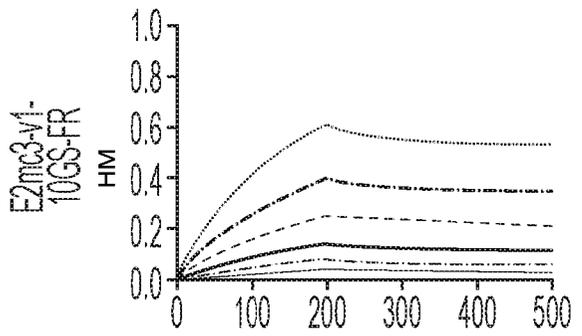
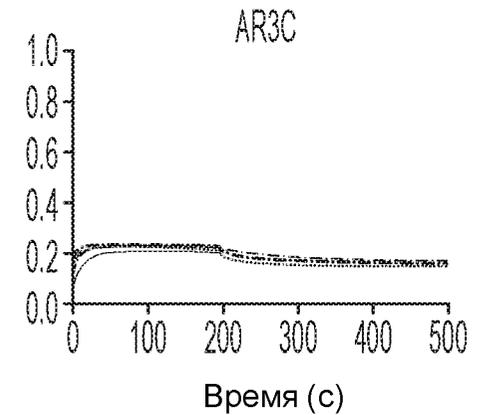
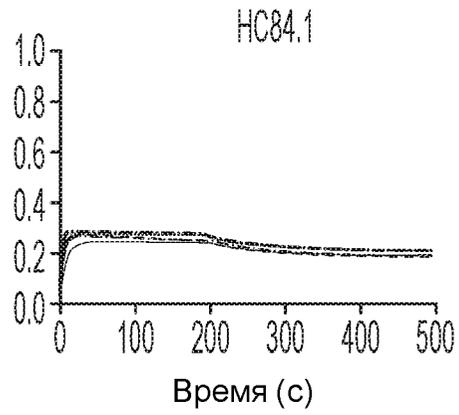
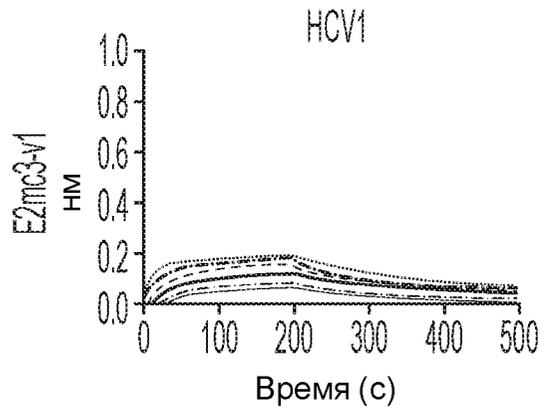
ФИГ. 10G



ФИГ. 10Н

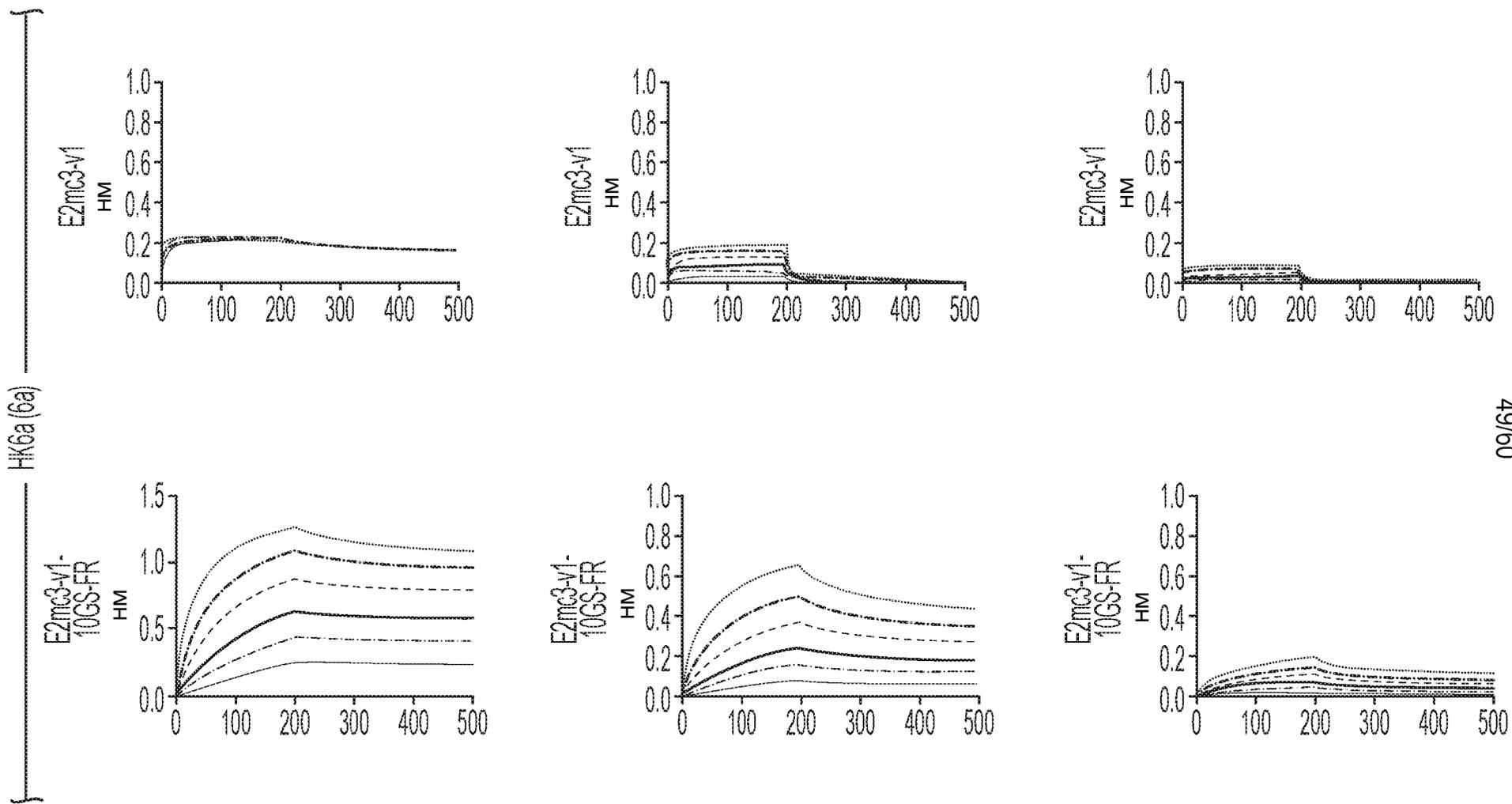


ФИГ. 10Н (Продолж.)

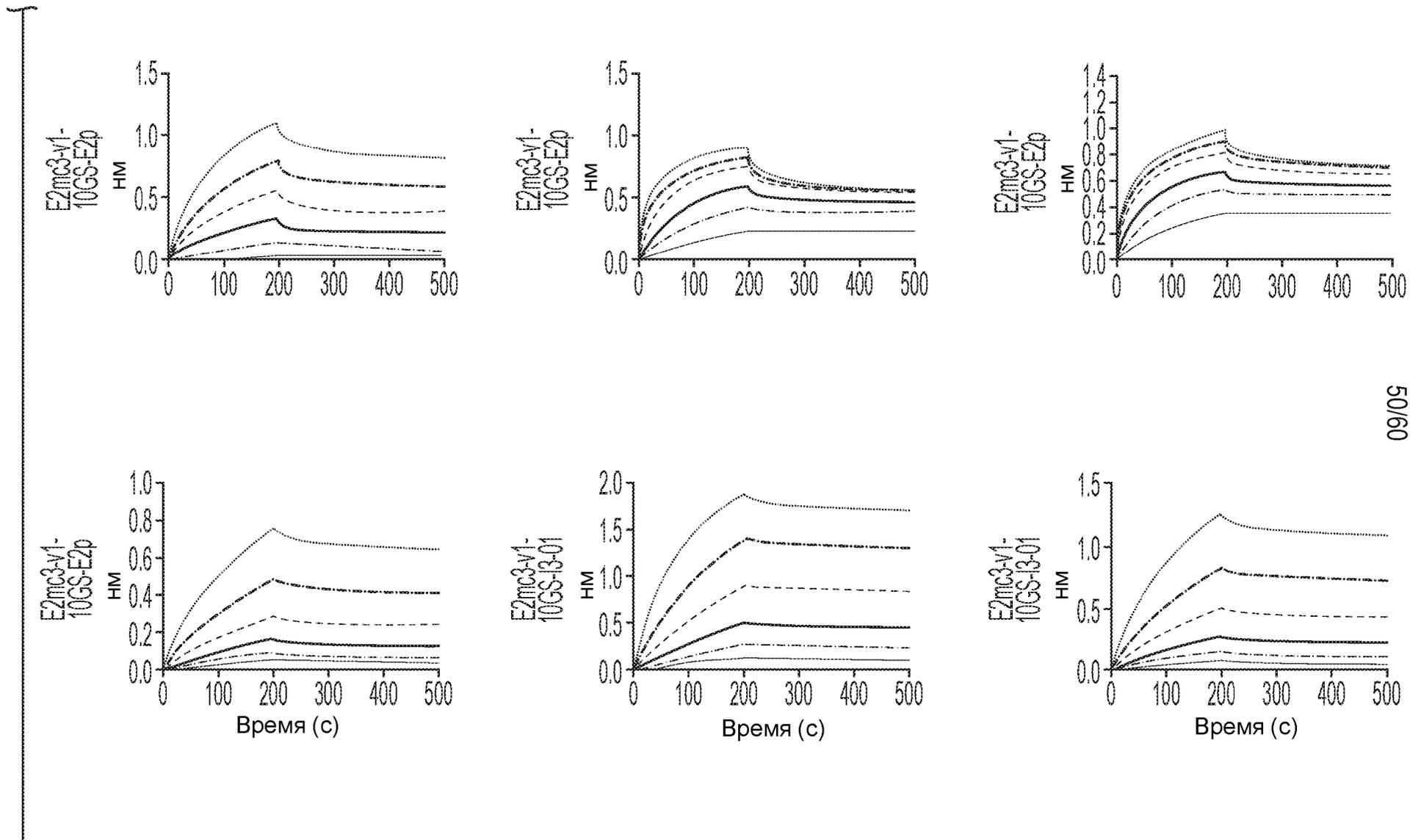


48/60

ФИГ. 10I

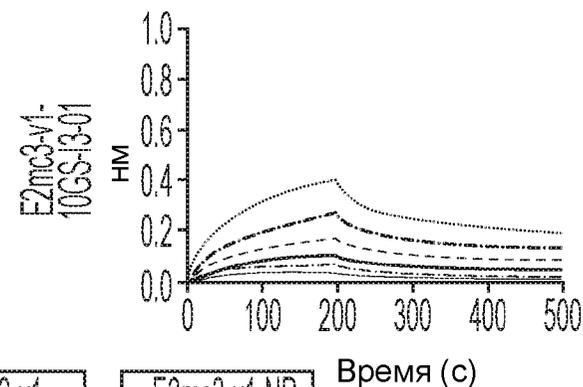
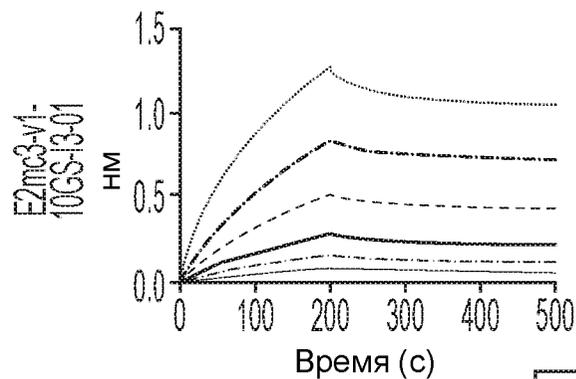
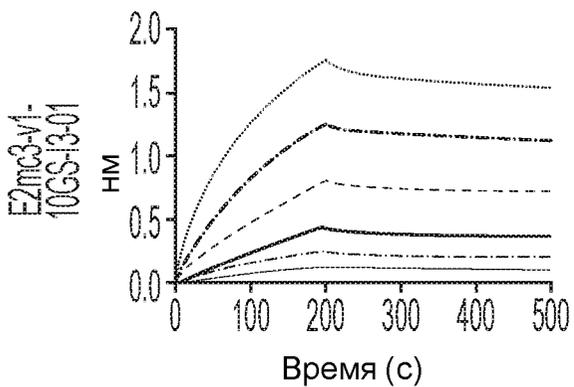
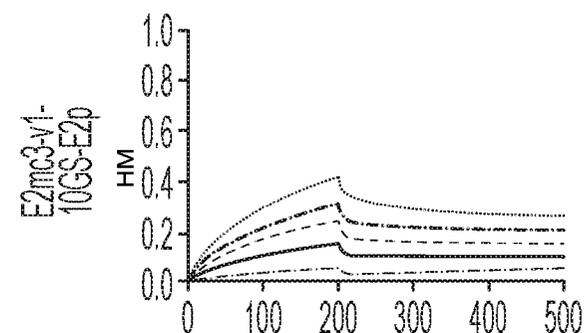
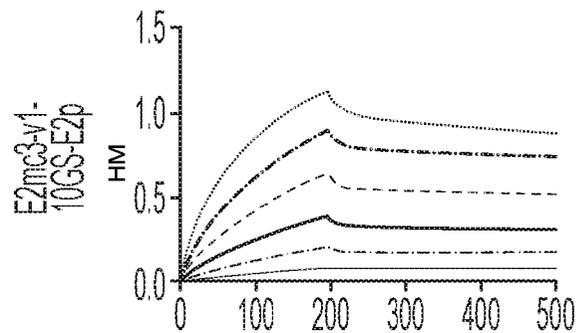
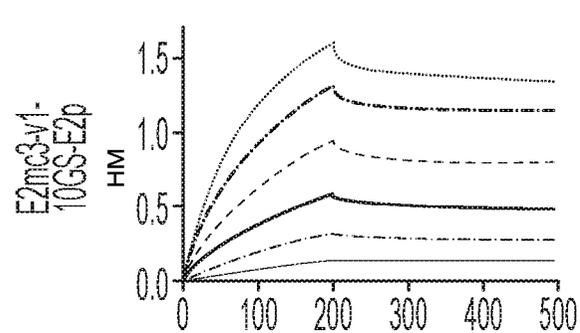


ФИГ. 10I (Продолж.)



50/60

ФИГ. 10I (Продолж.)



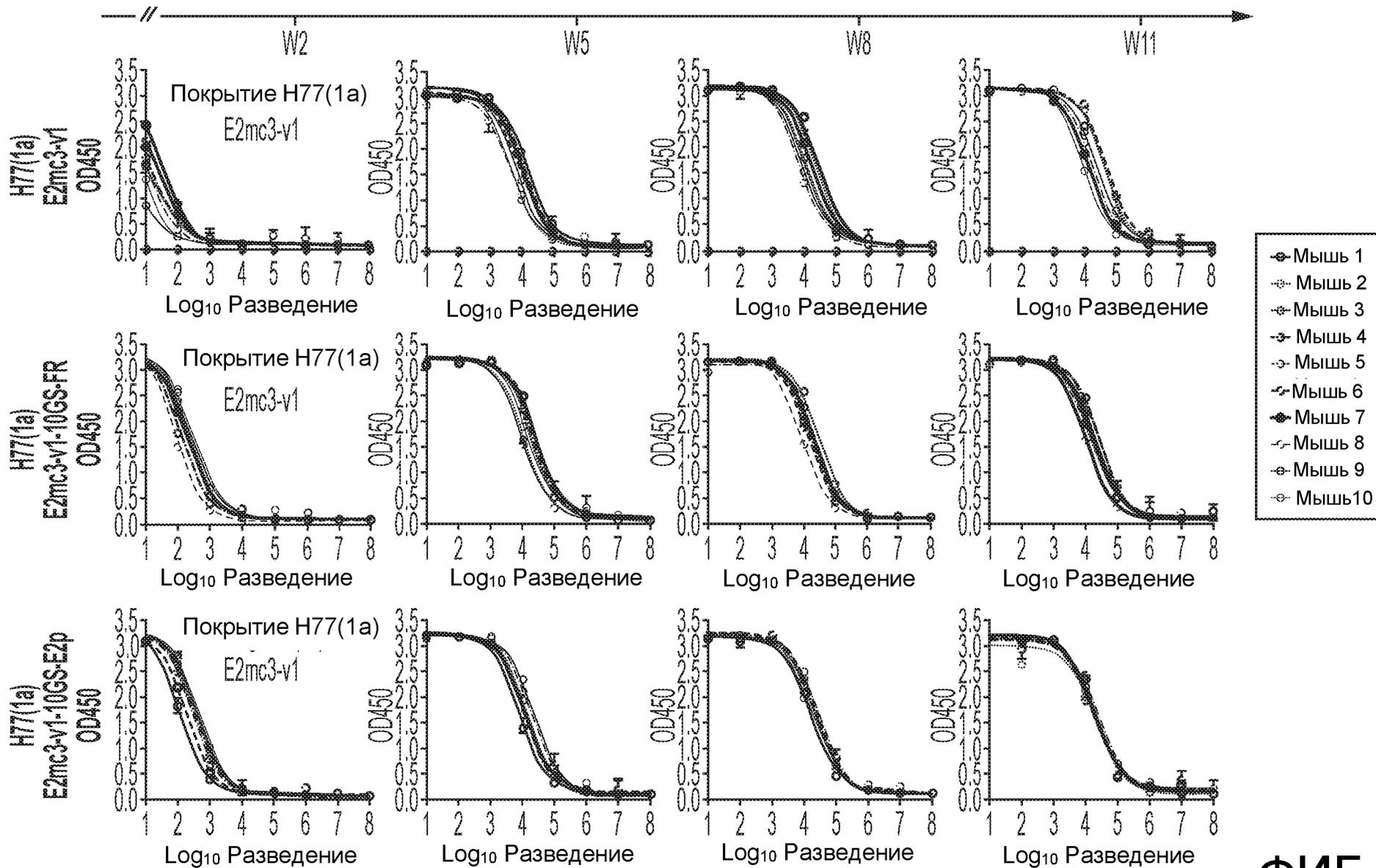
51/60

ФИГ. 10I (Продолж.)

E2mc3-v1		E2mc3-v1-NP	
.....	3,57 мкм	52,08 нм
-----	1,79 мкм	-----	26,04 нм
----	0,89 мкм	----	13,02 нм
———	0,45 мкм	———	6,51 нм
.....	0,22 мкм	3,26 нм
———	0,11 мкм	———	1,63 нм

Время (с)

Ответ сывороточных антител во время иммунизации мышей



52/60

ФИГ. 11А

Значения EC₅₀ сыворотки мышей из исследования № 1 по связыванию H77 E2mc3-v1^a

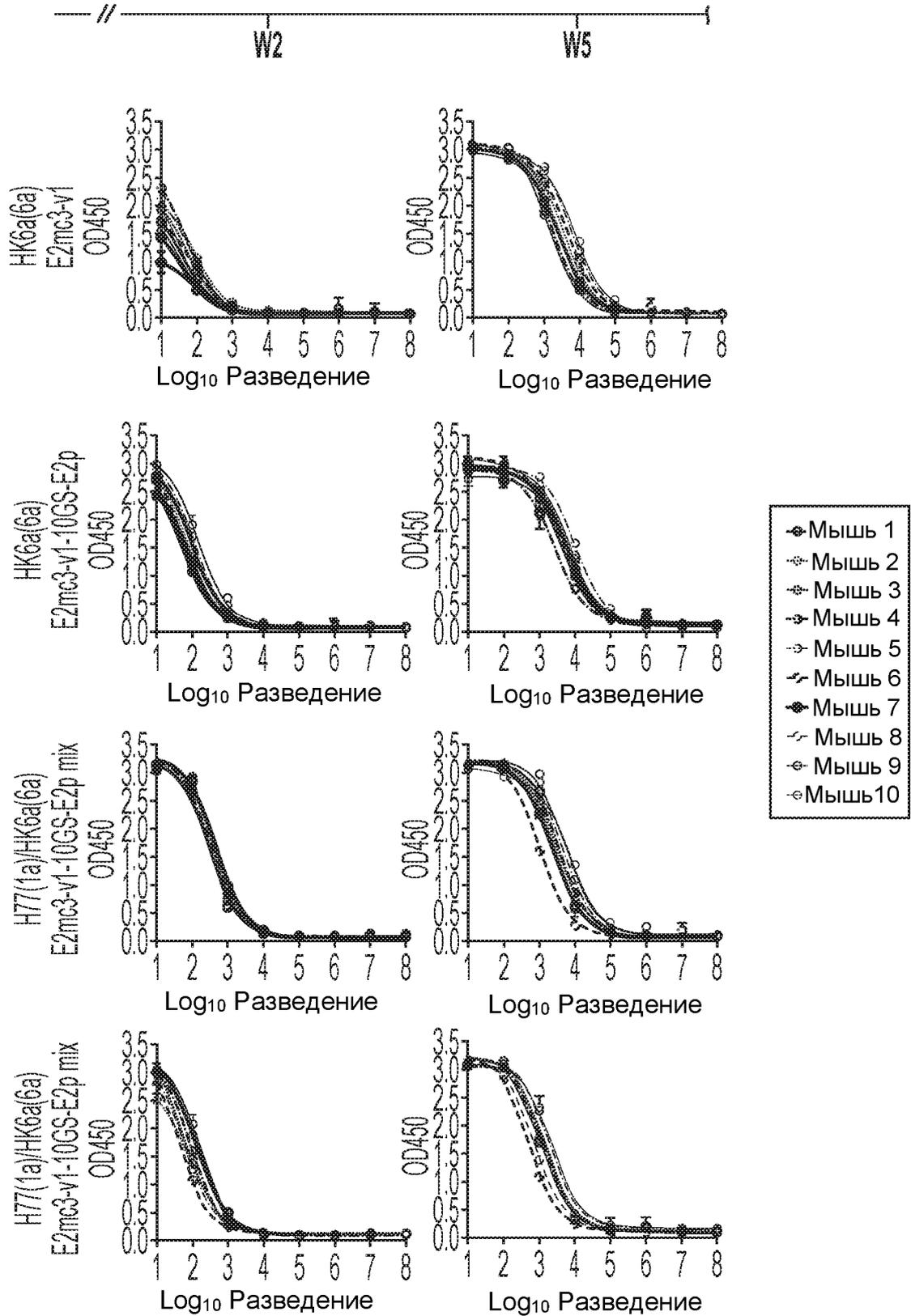
	W2			W5			W8			W11		
	E2mc3-v1	E2mc3-v1- FR	E2mc3-v1- E2p									
	M1	45.65	187.5	111.4	16664	26151	7611	16656	20693	15734	26922	17649
M2	35.33	120.5	253.5	11702	13274	10329	24286	19668	25039	41201	14666	17494
M3	27.42	228.7	421.2	7427	22099	14695	12729	33686	24650	25993	19679	17012
M4 ^b	-	133.5	379.6	-	25538	11473	-	17101	21928	-	27042	16985
M5	13.41	124.7	298.8	5242	20640	18250	6957	35842	26595	20309	16396	23639
M6	38.96	196.4	199	12123	29183	12959	19740	22697	27719	54269	18537	23137
M7	32.78	121.4	438.6	10134	20558	14652	13000	14444	23248	13421	10252	22005
M8	48.96	74.5	403.9	10186	9582	12977	31134	9176	26215	28858	10330	20674
M9	8.99	258.1	477.4	6559	10058	22251	9314	18901	19345	24221	15651	16983
M10	8.097	315.6	515.7	4895	16103	12300	10764	21685	18924	9493	17209	20705

^aВ исследовании №1 мышам вводили H77 E2mc3-v1 и три наночастицы. Значения EC₅₀ были рассчитаны на основе наилучшего подбора в GraphPad Prism 6.

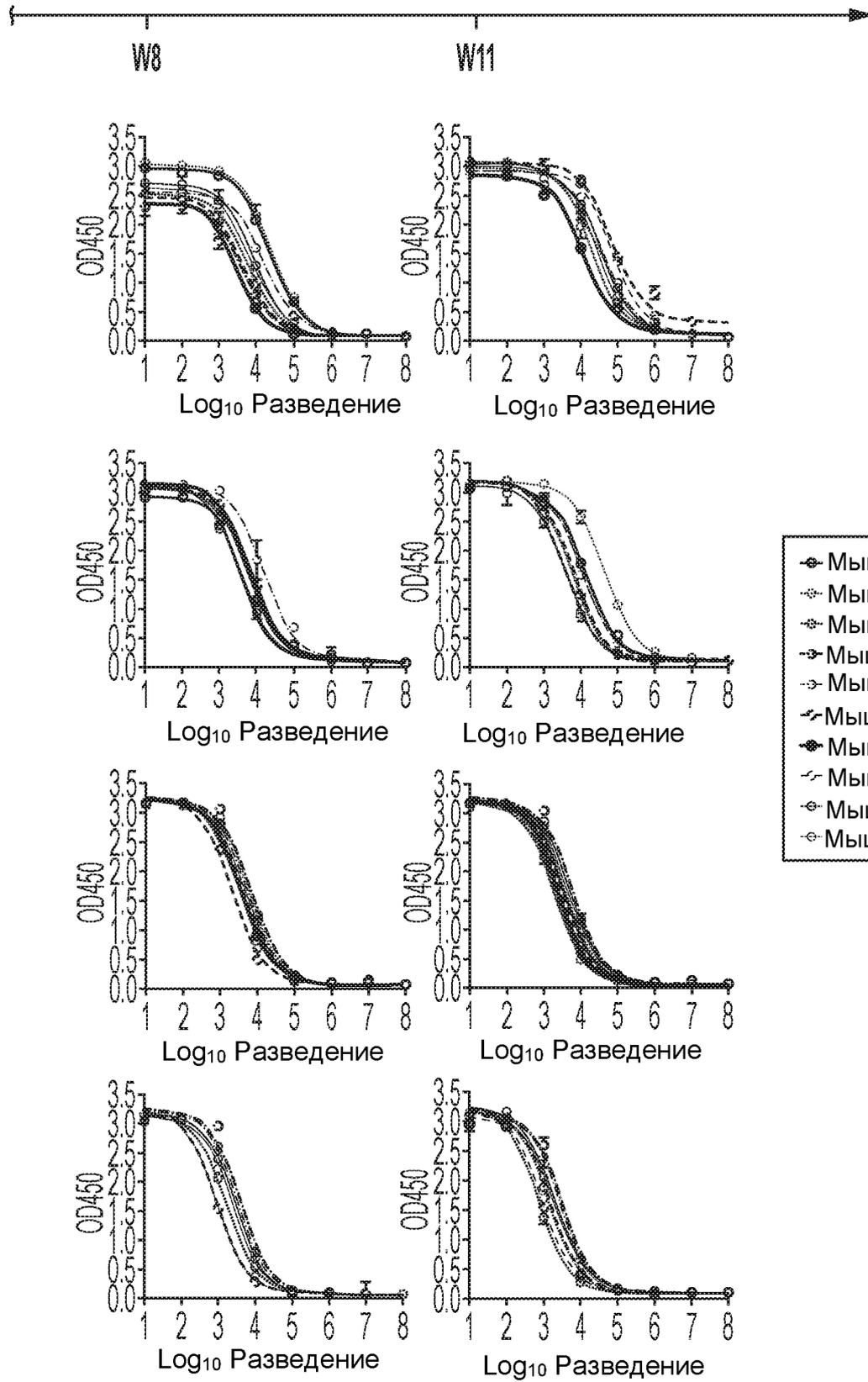
^bM4 в группе E2mc3-v1 умер вскоре после первой инъекции, на что указывает «-»

ФИГ. 11В

Ответ сывороточных антител во время иммунизации мышей



ФИГ. 11С



ФИГ. 11С (Продолж.)

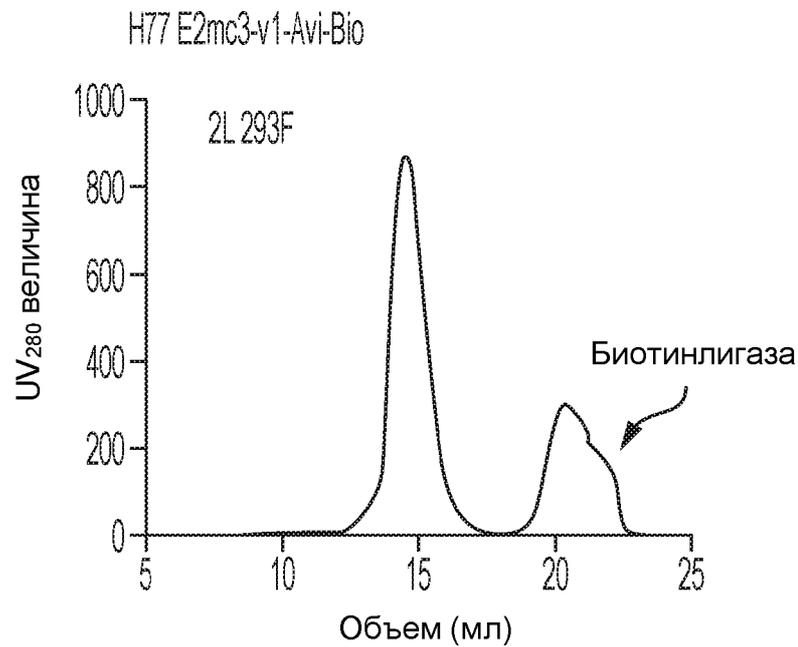
Значения EC₅₀ сыворотки мышей из исследования № 2 по связыванию H77 или НК6а E2mc3-v1^a

	W2				W5				W8				W11			
	E2mc3-v1/НК6а	E2p- /НК6а	E2p- mix/H77	E2p- mix/НК6а	E2mc3-v1/НК6а	E2p- /НК6а	E2p- mix/H77	E2p- mix/НК6а	E2mc3-v1/НК6а	E2p- /НК6а	E2p- mix/H77	E2p- mix/НК6а	E2mc3-v1/НК6а	E2p- /НК6а	E2p- mix/H77	E2p- mix/НК6а
M1	36.44	57.23	306.2	87.92	2536	4152	3007	1177	23668	5399	4670	2171	27580	13634	3734	1375
M2	91.76	85.23	332.7	78.19	3859	7285	3007	1483	26324	6025	4616	2034	77268	44791	4154	1108
M3	51.32	51.48	399.2	62.26	2864	6936	2352	1128	5734	6315	3498	1668	18754	5244	2068	719.9
M4 ^b	53.05	65.53	359.2	81.48	1675	2658	3169	1508	4243	6359	6933	4249	19549	3916	6201	3204
M5	60.35	116.9	419.5	53.01	6542	10938	4165	2108	15942	14805	6033	3367	40012	9942	3898	2609
M6	67.18	52.19	340.6	38.93	3359	2649	924	514.4	4006	7421	2276	886	73413	6369	2238	743
M7	96.09	52.14	358.9	145.9	3193	4062	2111	767.9	2660	6536	4169	2153	11387	5148	2616	1280
M8	31.99	99.93	482.1	150.3	4293	6946	3802	1447	6461	6138	4654	2050	74357	5673	3055	881.3
M9	35.05	156.6	318.9	160.7	1430	5808	5347	2225	8582	3526	6081	2866	39734	3810	5125	2255
M10	31.36	137.7	304.2	120.1	7300	5819	5406	2204	7968	4166	5594	2682	27205	3709	5003	2141

^aВ исследовании № 2 трем группам мышей вводили НК6а E2mc3-v1, НК6а E2mc3-v1-10GS-E2p и смесь НК6а/H77 E2mc3-v1-10GS-E2p. В анализе сыворотки антигеном покрытия был НК6а E2mc3-v1 для группы 1 и группы 2, в то время как H77 E2mc3-v1 и НК6а E2mc3-v1 использовали в качестве антигена покрытия для группы 3 и анализировали в двух отдельных экспериментах. В этой таблице антиген покрытия показан после «/». Значения EC₅₀ были рассчитаны на основе наилучшего подбора в GraphPad Prism 6.

56/60

ФИГ. 11D



ФИГ. 12А

H77 E2mc3-v1-специфичная объемная сортировка В-клеток селезенки мышей из исследования №1

Образец мыши	Сортированные клетки	Частота E2mc3-v1-специфичных В-клеток	E2mc3-v1-специфичные В-клетки на 10 миллионов клеток селезенки
G1-1	269	0.02%	1771
G1-3	294	0.01%	769
G1-5	70	0.02%	2107
G1-6	383	0.02%	1655
G1-10	42	0.01%	1151
G3-5	639	0.02%	2065
G3-7	519	0.04%	3851
G3-8	296	0.03%	2968
G3-9	145	0.02%	1618
G3-10	565	0.03%	2962

ФИГ. 12В

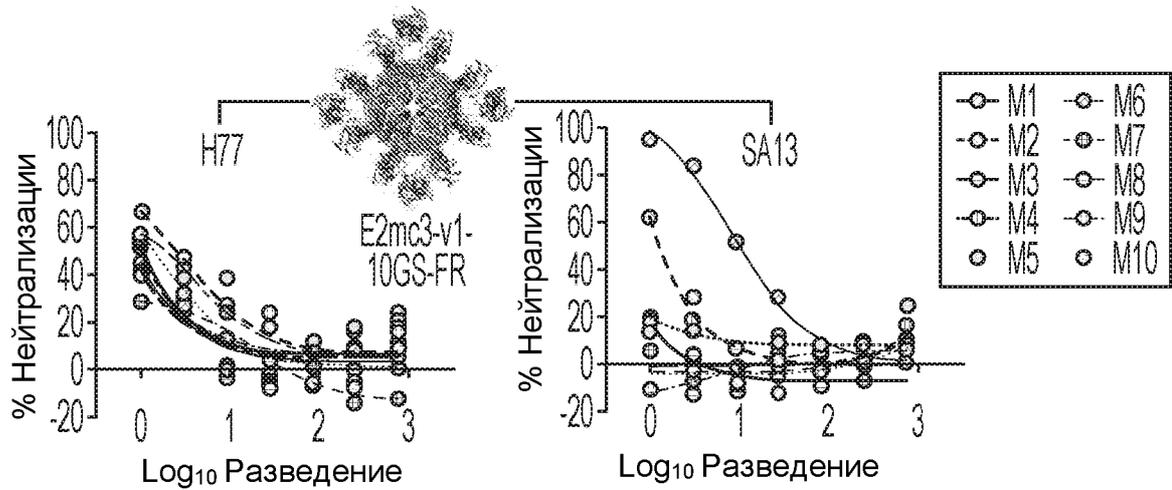
Анализ антител данных секвенирования следующего поколения (NGS), полученных для В-клеток селезенки мышей, отсортированных по E2mc3-v1^a

Образец мыши	N _{Raw}	N _{Align}	Цепь	N _{Chain}	<Длина>	N _{Usable}	Perc _{Usable}
G1-1	754,261	448,586	H	292,627	574.1	286,978	98.1%
			K	155,959	515.9	154,780	99.2%
G1-3	786,781	509,031	H	301,785	543.4	350,416	99.6%
			K	157,246	518.2	156,928	99.8%
G1-5	995,967	250,954	H	13,791	552.7	13,629	98.8%
			K	237,163	508.5	235,538	99.3%
G1-6	830,128	96,295	H	57,820	571.1	55,754	96.4%
			K	38,475	555.8	37,189	96.7%
G1-10	826,370	358,931	H	180,016	657.9	170,128	94.5%
			K	178,915	505.7	177,145	99.0%
G3-5	2,370,390	757,676	H	471,407	636.6	469,623	99.6%
			K	286,269	509.2	285,645	99.8%
G3-7	2,310,407	378,836	H	194,360	571.7	193,698	99.7%
			K	184,476	498.1	180,878	98.0%
G3-8	1,215,653	414,054	H	180,968	625.0	180,367	99.7%
			K	233,086	509.9	232,190	99.6%
G3-9	1,788,762	348,596	H	191,028	631.3	188,161	98.5%
			K	157,568	506.9	157,069	99.7%
G3-10	971,175	471,436	H	262,416	646.6	260,219	99.2%
			K	209,020	524.2	207,506	99.3%

58/60

^aПеречисленные элементы включают идентификатор образца мыши, количество необработанных прочтений (N_{Raw}), количество последовательностей после назначения гена V_H/V_K и удаления фрагментов с выравниванием V-гена 250 п.н. или короче (N_{Align}), тип цепи (H или K), количество цепей V_H/V_K, среднюю длину считывания определенного типа цепи, количество пригодных для использования цепей антител полной длины после обработки конвейера анализа антител (N_{Usable}) и процент пригодных для использования цепей (Perc_{Usable}=N_{Usable}/N_{Chain}[100%]). NGS выполняли на Ion S5 с использованием чипа Ion 530.

ФИГ. 12С

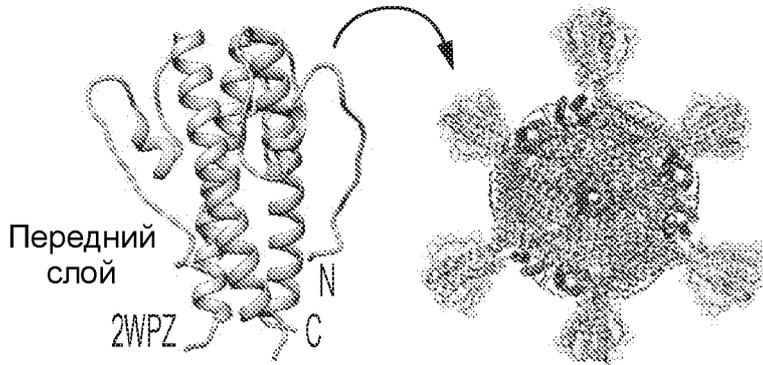


ФИГ. 13А

Дизайн эпитоп-скаффолда переднего слоя

Передний слой HINSTALNCNESLNTGWLAGLFYQHKFDSSG
 2WPZ_A_FL HINSTALNCNESLNTGWLAGLFYQHKFDSSGRMKQLEDKVVETNLSKVYHNENQVARL
 2WPZ_A_(PDB) -----RMKQLEDKVEENLSKVYHNENEVARL
 -----***** ***** *****

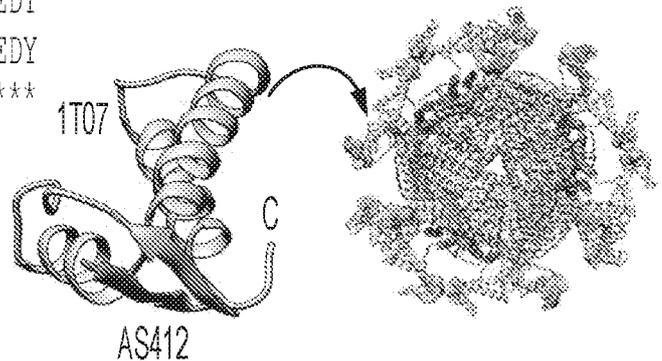
2WPZ_A_FL KKLVGER
 2WPZ_A_(PDB) KKLVGER



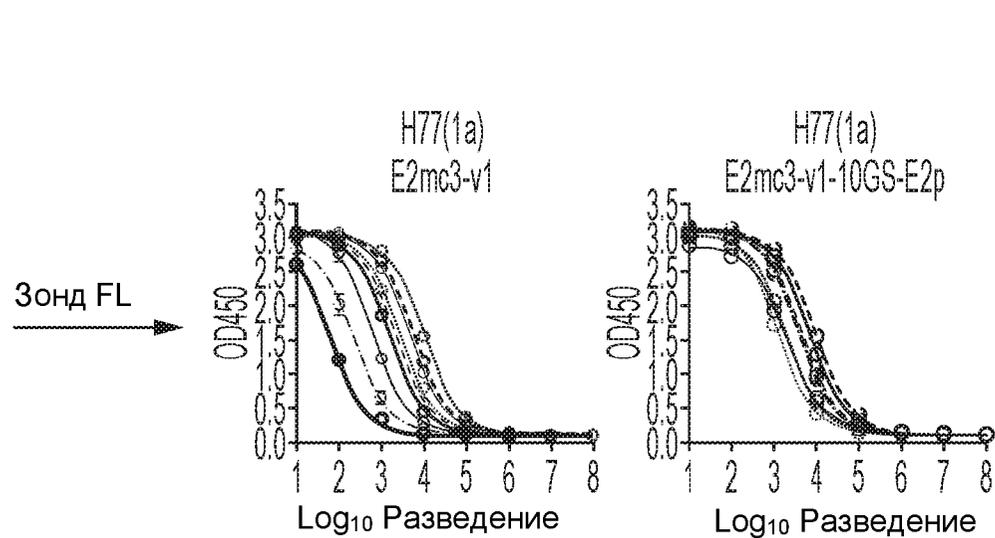
AS412 дизайн эпитоп-скаффолда

AS412 ----QLINTNG--SWHIN
 1T07_A_AS412 ----RLVNCNG--SWLIGLDRPPYPGAKGEDINYNNVSRKAWDEWQKHQTMLINERRL
 1T07_A_(PDB) GHMSRTVMCRKYHEELPGLDRPPYPGAKGEDINYNNVSRKAWDEWQKHQTMLINERRL
 * * * * * *****

1T07_A_AS412 NMMNAEDRKFLQQEMDKFLSGEDY
 1T07_A_ NMMNAEDRKFLQQEMDKFLSGEDY



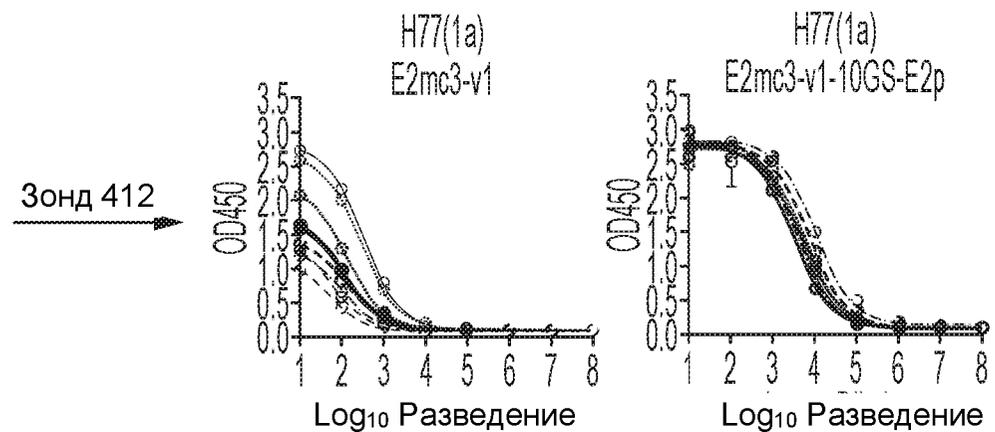
ФИГ. 13В



- Мышь 1
- Мышь 2
- Мышь 3
- Мышь 4
- Мышь 5
- Мышь 6
- Мышь 7
- Мышь 8
- Мышь 9
- Мышь 10

EC₅₀ величины связывания
сыворотки

	V1	E2p
M1	1425	6692
M2	2715	1148
M3	10066	1939
M4	-	1852
M5	220.3	3428
M6	5783	9818
M7	67.45	4791
M8	2023	7047
M9	598.8	2205
M10	4493	3712



- Мышь 1
- Мышь 2
- Мышь 3
- Мышь 4
- Мышь 5
- Мышь 6
- Мышь 7
- Мышь 8
- Мышь 9
- Мышь 10

EC₅₀ величины связывания
сыворотки

	V1	E2p
M1	109.1	3088
M2	287.8	3504
M3	134.6	6124
M4	-	4625
M5	81.13	10472
M6	127.3	6717
M7	48.61	5911
M8	122.7	5574
M9	60.34	5903
M10	349.7	3919

ФИГ. 13С