

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290897** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.19

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

(22) Дата подачи заявки
2020.09.08

**(54) ПОЛИПЕПТИДЫ, ИМИТИРУЮЩИЕ ЭПИТОП ШИРОКОНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО
АНТИТЕЛА VRC01, В КАЧЕСТВЕ АНТИГЕНОВ ДЛЯ ВАКЦИНЫ,
ПРЕДОТВРАЩАЮЩЕЙ ИНФЕКЦИЮ ВИЧ-1**

(31) **PV 2019-585**

(32) **2019.09.13**

(33) **CZ**

(86) **PCT/CZ2020/050066**

(87) **WO 2021/047698 2021.03.18**

(71) Заявитель:
**УНИВЕРЗИТА ПАЛАЦКЕГО В
ОЛОМОУЦИ (CZ)**

(72) Изобретатель:

Мали Петр, Раска Милан, Кухар

Милан, Косзтиу Петр, Туранек

Ярослав, Петрокова Гана (CZ)

(74) Представитель:

Нагорных И.М. (RU)

(57) Изобретение относится к полипептиду, имитирующему эпитоп гликопротеина gp120 вируса ВИЧ-1, который распознается паратопом широконейтрализующего антитела VRC01, имеет длину до 100 аминокислотных остатков и содержит аминокислотную последовательность

$X^1YKNX^2INX^3AX^4X^5VX^6X^7VKRX^8IDX^9ILAX^{10}LP$ (SEQ ID NO. 1),

в которой X^1 выбран из аминокислот A, N, R; X^2 выбран из аминокислот A, R, D; X^3 выбран из аминокислот R, V, P; X^4 выбран из аминокислот V, L, S; X^5 выбран из аминокислот T, G, R; X^6 выбран из аминокислот G, T; X^7 выбран из аминокислот L, A; X^8 выбран из аминокислот V, I; X^9 выбран из аминокислот G, A, R; X^{10} выбран из аминокислот R, A, G; с непосредственно присоединенной альфа-спиральной структурой на N-конце или C-конце.

A1

202290897

202290897

A1

ПОЛИПЕПТИДЫ, ИМИТИРУЮЩИЕ ЭПИТОП ШИРОКОНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО
АНТИТЕЛА VRC01, В КАЧЕСТВЕ АНТИГЕНОВ ДЛЯ ВАКЦИНЫ,
ПРЕДОТВРАЩАЮЩЕЙ ИНФЕКЦИЮ ВИЧ-1

Область техники

Настоящее изобретение относится к новому классу полипептидов, которые подходят в качестве антигенов, имитирующих эпипептид шиповидного отростка гликопротеина gp120 ВИЧ-1, распознаваемого широконейтрализующим антителом VRC01, и, таким образом, подходят в качестве иммуногенов для стимуляции продукции нейтрализующих антител к ВИЧ-1 и для разработки вакцины, предотвращающей заражение ВИЧ.

Уровень техники

Инфекция ВИЧ-1 и синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) представляют собой глобальную пандемию, унесшую примерно 35 миллионов жизней во всем мире. Несмотря на интенсивные исследования, не существует коммерческой вакцины. Наиболее важными препятствиями являются огромная антигенная изменчивость ВИЧ-1 и уникальные биохимические, биологические и иммунологические свойства наиболее многообещающего кандидата на вакцину, гликопротеина оболочки ВИЧ-1 (Env), который отвечает за прикрепление ВИЧ-1 и проникновение в клетку-хозяина (Robinson HL HIV/AIDS Vaccines: 2018. Clin Pharmacol Ther 2018, 104: 1062-73; Moore PL The Neutralizing Antibody Response to the HIV-1 Env Protein. Curr HIV Res 2018, 16: 21-8). Env представляет собой тример белков gp160, расщепленный на две функциональные субъединицы: трансмембранный гликопротеин gp41 и гликопротеин gp120, экспонируемый на поверхности вируса. Большинство идентифицированных и клонированных антител человека, способных нейтрализовать широкий спектр вариантов Env ВИЧ-1 (bn-mAb), включая VRC01, распознают субъединицы gp120.

Новые стратегии в разработке вакцины против ВИЧ-1 поощрялись после идентификации нескольких таких bn-mAb, поскольку они могли ограничивать

виремию, как показано для элитных нейтрализаторов, группы индивидуумов с широкой и мощной нейтрализующей активностью. Генерация специфических bn-mAb к ВИЧ-1 в естественных условиях представляет собой долгосрочный процесс, длящийся годами, и его трудно вызвать с помощью обычной вакцинации. Большинство идентифицированных bn-mAb обладают уникальными свойствами, включая длинный HCDR3, необычайную частоту мутаций V(D)J и поли- или аутореактивность с липидами и белками человека, что, по-видимому, является серьезным препятствием для разработки успешной стратегии вакцинации.

Несмотря на увеличение знаний о молекулярной структуре гликопротеина Env ВИЧ-1, его взаимодействии с нейтрализующими антителами и механизме развития иммунного ответа, современные вакцины вызывают иммунный ответ с низкой эффективностью и недостаточным разнообразием вариантов ВИЧ-1. (T. Q. Zhou, I. Georgiev, X. L. Wu, Z. Y. Yang, K. F. Dai, A. Finzi, Y. D. Kwon, J. F. Scheid, W. Shi, L. Xu, Y. P. Yang, J. A. Zhu, M. C. Nussenzweig, J. Sodroski, L. Shapiro, G. J. Nabel, J. R. Mascola, P. D. Kwong, Structural Basis for Broad and Potent Neutralization of HIV-1 by Antibody VRC01. *Science* 329, 811-817 (2010); K. J. Bar, M. C. Sneller, L. J. Harrison, J. S. Justement, E. T. Overton, M. E. Petrone, D. B. Salantes, C. A. Seamon, B. Scheinfeld, R. W. Kwan, G. H. Learn, M. A. Prosschan, E. F. Kreider, J. Blazkova, M. Bardsley, E. W. Refsland, M. Messer, K. E. Clarridge, N. B. Tustin, P. J. Madden, K. S. Oden, S. J. O'Dell, B. Jarocki, A. R. Shiakolas, R. L. Tressler, N. A. Doria-Rose, R. T. Bailer, J. E. Ledgerwood, E. V. Capparelli, R. M. Lynch, B. S. Graham, S. Moir, R. A. Koup, J. R. Mascola, J. A. Hoxie, A. S. Fauci, P. Tebas, T. W. Chun, Effect of HIV Antibody VRC01 on Viral Rebound after Treatment Interruption. *New England Journal of Medicine* 375, 2037-2050 (2016)).

Одним из инновационных решений для преодоления существующих проблем с разработкой эффективной стратегии вакцинации против ВИЧ-инфекции является стимуляция продукции нейтрализующих антител к гликопротеину Env вируса ВИЧ-1 методом направленной эволюции белков, которые могут представлять собой белковые реплики эпитопов, распознаваемых хорошо изученными нейтрализующими антителами (bn-mAb). Эти небольшие связывающие белки можно затем использовать в качестве рекомбинантных антигенов для

конструирования вакцины, которая будет стимулировать иммунную систему хозяина к выработке сывороточных антител требуемой специфичности и нейтрализующей широты, аналогичных первоначально использовавшимся нейтрализующим Env-специфическим моноклональным антителам (bn-mAb).

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к полипептидам, имитирующим эпитоп гликопротеина gp120 вируса ВИЧ-1, распознаваемый моноклональным антителом VRC01, полученным из искусственных связывающих белков, идентифицированных путем отбора из высокосложной комбинаторной библиотеки белковых вариантов (Фиг. 1), полученных из родительской структуры альбумин-связывающего домена стрептококкового белка G (Ahmad JN, Li J, Biedermannova L, et al Novel high-affinity binders of human interferon gamma derived from albumin-binding domain of protein G. *Proteins* 2012, 80: 774-89), по методу рибосомного дисплея.

Настоящее изобретение относится к полипептидам, имитирующим эпитоп гликопротеина gp120 вируса ВИЧ-1, который распознается широким спектром нейтрализующих антител VRC01 (т.е. полипептидных антигенов). Эти полипептиды содержат аминокислотную последовательность:

X¹YKNX²INX³AX⁴X⁵VX⁶X⁷VKRX⁸IDX⁹ILAX¹⁰LP (SEQ ID NO. 1), с N-концевой или C-концевой связанной альфа-спиральной структурой, причем указанная альфа-спиральная структура предпочтительно представляет собой последовательность LAEAKVLANRELDKYGVSD (SEQ ID NO. 2). Альфа-спиральная структура непосредственно связана с SEQ ID NO. 1.

X¹ выбран из аминокислот A, N, R;

X² выбран из аминокислот A, R, D;

X³ выбран из аминокислот R, V, P;

X⁴ выбран из аминокислот V, L, S;

X⁵ выбран из аминокислот T, G, R;

X⁶ выбран из аминокислот G, T;

X⁷ выбран из аминокислот L, A;

X⁸ выбран из аминокислот V, I;

X⁹ выбран из аминокислот G, A, R;

X¹⁰ выбран из аминокислот R, A, G.

Предпочтительно настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей:

AYKNAINRAVTVGLVKRVIDGILARLP (SEQ ID NO: 3),

NYKNRINVALGGTAVKRIIDAILAALP (SEQ ID NO: 4),

RYKNDINPASRVGAVKRVIDRILAGLP (SEQ ID NO: 5),

с N-концевой или C-концевой присоединенной альфа-спиральной структурой.

Настоящее изобретение предпочтительно относится к полипептидам, содержащим последовательность, выбранную из группы, включающей:

LAEAKVLANRELDKYGVSDAYKNAINRAVTVGLVKRVIDGILARLP (SEQ. ID NO. 6),

LAEAKVLANRELDKYGVSDNYKNRINVALGGTAVKRIIDAILAALP (SEQ. ID NO. 7),

LAEAKVLANRELDKYGVSDRYKNDINPASRVGAVKRVIDRILAGLP (SEQ. ID NO. 8).

В рамках настоящего изобретения было обнаружено, что полипептиды согласно настоящему изобретению связываются со всем моноклональным антителом IgG VRC01, а также с Fab-фрагментом VRC01. Полипептид может быть произвольно удлинен с обеих сторон, например, содержать до 100 аминокислотных остатков, предпочтительно до 80, или до 70, или до 60, или до 50 аминокислот. На иммунный ответ, вызванный полипептидами, можно воздействовать комбинацией начальной иммунизирующей дозы и последующих бустерных доз, при которых укороченная версия конкретной белковой последовательности может сузить иммунный ответ и выработку антител к части родственного белка, соответствующей SEQ ID NO. 1.

Настоящее изобретение дополнительно относится к последовательности ДНК, выбранной из группы, включающей комплементарную ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность полипептидов по настоящему изобретению, и ДНК, гибридизующуюся с указанной комплементарной ДНК в условиях с высокой

степенью строгости. Условия с высокой степенью строгости относятся к следующим условиям и раствору для промывки меченого ДНК-зонда: промывающий раствор, содержащий $0,5 \times \text{SSC} + 0,1\% \text{ SDS}$, температура 60°C .

Настоящее изобретение дополнительно включает применение указанной последовательности ДНК для получения полипептидов или рекомбинантных белков, продуцируемых в клетках-хозяевах бактерий, дрожжей, насекомых, млекопитающих или человека, а также в этих клетках-хозяевах, содержащих по меньшей мере одну последовательность ДНК по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение дополнительно включает применение указанной последовательности ДНК в качестве активного ингредиента ДНК-вакцины для профилактики заражения вирусом ВИЧ-1. ДНК-вакцины содержат ДНК для введения в клетки, поэтому клетки-хозяева непосредственно продуцируют антиген, стимулирующий превентивный иммунный ответ. Иммунные клетки распознают такой антиген как гетерогенную структуру, зрелую и ответственную за развитие антиген-специфического иммунного ответа. ДНК может быть введена в организм хозяина свободно или инкапсулирована в белок для упрощения проникновения в клетку-хозяина.

Полипептиды согласно настоящему изобретению подходят для использования в фармацевтической технологии, в частности, в качестве имитации рекомбинантных белковых лигандов для разработки более эффективной вакцины, предотвращающей заражение вирусом ВИЧ-1. С этой целью особенно предпочтительно присоединять дополнительные вспомогательные белки к полипептидам согласно настоящему изобретению, причем указанные вспомогательные белки подходят для стимуляции продукции антител. Примеры вспомогательных белков включают сывороточный альбумин, белок теплового шока hsp70 или спиральный спейсерный белок TolA или его укороченную версию TolS. Эти вспомогательные белки могут быть ковалентно связаны с полипептидами, образуя таким образом химерный белок. Кроме того, полипептиды согласно настоящему изобретению могут быть модифицированы путем присоединения вспомогательных N- или C-концевых последовательностей (меток), которые способствуют их специфической детекции или их ориентированной иммобилизации

на поверхности носителей, таких как нанолипосомы, что приводит к повышению эффективности иммунизации. Такие метки включают, например, метки аффинности или детекции как poly(His), FLAG, AviTag, HA, Myc, S-tag или V5-tag.

Полипептиды согласно настоящему изобретению, определенные аминокислотной последовательностью, показанной выше, стимулируют выработку сывороточных антител после их использования для иммунизации экспериментальных животных. Гипериммунные сыворотки иммунизированных животных подавляли заражение репортерных клеток тестируемыми Env-псевдотипированными вирусами в модельной системе, что представляет собой один из ключевых механизмов борьбы с инфекцией ВИЧ-1 и одну из целей разработки профилактической вакцины, которая до сих пор не доступна на рынке. Полипептиды были идентифицированы из ABD-производных библиотеки рандомизированных пептидов как пептиды с наивысшим специфическим связыванием с моноклональным антителом VRC01, которое было выявлено у индивидуума, инфицированного вирусом ВИЧ-1, как один из решающих факторов, поддерживающих длительный низкий уровень ВИЧ-1 в его сыворотке и способствующий устойчивости к развитию СПИДа даже без применения антиретровирусных препаратов. VRC01 известен своей способностью нейтрализовать широкий спектр вариантов ВИЧ-1, выявленных в разных регионах мира. Обнаруженные полипептиды имитируют структуру, распознаваемую антителом VRC01 (эпитоп, распознаваемый антителом). Преимущество этих полипептидов по сравнению с испытываемыми в настоящее время вакцинами заключается в простоте получения, стабильности и отсутствии посттрансляционных модификаций, что позволяет биотехнологически легко получать их в прокариотических клетках-хозяевах *Escherichia coli* и использовать в дальнейшем в качестве вакцинных антигенов.

Краткое описание чертежей

Фигура 1. Схематическое изображение выявления Env-специфических нейтрализующих сывороточных антител с использованием белковых связывателей, выбранных из библиотеки ABD. Широконейтрализующее антитело

VRC01 использовали в качестве мишени для отбора связывателей из комбинаторной библиотеки ABD с теоретической сложностью 10^{14} вариантов. Отрицательную селекцию использовали для минимизации присутствия связывателей, не участвующих в распознавании эпитопов. Положительную селекцию проводили в 96-луночных планшетах с иммобилизованным VRC01 bn-mAb с последующим выделением мРНК, обратной транскрипцией в кДНК и отбором рибосомного дисплея. После нескольких циклов селекции в плазмидный вектор вводили библиотеку вариантов кДНК, называемых связывателями VRA. Три варианта VRA017, VRA019 и VRA177 были идентифицированы как наиболее многообещающие кандидаты и в форме рекомбинантных слитых белков, включая укороченную версию VRA017, обозначенную как VRA017S, использовали для иммунизации экспериментальных мышей с последующим анализом их гипериммунных сывороток в отношении их Env-специфичности к ВИЧ-1 и нейтрализующей активности псевдовируса ВИЧ-1.

Фигура 2. Идентификация лигандов VRA паратопа VRC01, выбранного из библиотеки ABD. Варианты, предпочтительно связывающиеся с IgG VRC01, идентифицировали с помощью ELISA. Клеточные лизаты клонов VRA подвергали скринингу на связывание с VRC01 IgG и контролем изотипа IgG. Клоны VRA получали в виде биотинилированных слитых белков His6-VRA-TolA-AVI, и связывание с IgG визуализировали с помощью конъюгата стрептавидин-HRP. Родительский биотинилированный белок His6-ABDwt-TolA-AVI использовали в качестве отрицательного контроля. Связывание гликопротеина V5-tag-gp120 с антителом VRC01 использовали в качестве положительного контроля, обнаруживаемого с помощью конъюгата анти-V5 Ab-HRP.

Фигура 3. Структура домена ABD с 11 рандомизированными аминокислотами.

Фигура 4. (a) Связывание белков VRA017-, VRA019- и VRA177-TolA-AVI с VRC01, контрольным изотипом IgG kappa и BSA в ELISA. Связывание ABDwt-TolA-AVI в качестве исходного немутированного белка с VRC01 показано в сравнении с VRA019-TolA-AVI. (b) Связывание белков VRA017-, VRA019- и VRA177-TolA-AVI с фрагментом VRC01/Fab и BSA в ELISA. Все белки VRA и ABDwt были

биотинилированы и обнаружены конъюгатом стрептавидин-HRP. Каждый эксперимент показан как среднее значение трипликата со стандартным отклонением (SD).

Фигура 5. Белки VRA конкурируют с gp120 за связывание с VRC01. Увеличение концентрации gp120 ингибирует связывание белков VRA017-, VRA019- и VRA177-TolA-AVI при постоянной концентрации 2×10^{-7} М с VRC01 IgG (a) и VRC01 Fab (b). Все белки VRA и ABDwt были биотинилированы и обнаружены конъюгатом стрептавидин-HRP. Результаты каждого эксперимента показаны как среднее значение трипликата (дубликата в случаях экспериментов по конкуренции VRA019 и VRA177) со стандартным отклонением (SD).

Фигура 6. Малый связывающий белок VRA017 конкурирует с гликопротеином gp120 за связывание с антителом VRC01. Увеличение концентрации слитого белка VRA017-TolA-AVI в качестве конкурента снижает связывание gp120 при постоянной концентрации 5×10^{-10} М с IgG VRC01 (слева) и с Fab-фрагментом VRC01 (справа). Обнаружено с помощью ELISA с конъюгатом анти-V5 Ab-HRP.

Фигура 7. Сыворотка мышей, иммунизированных VRA017, VRA177, VRA019 и VRA017S, специфически распознает Env ВИЧ-1. а) Мышей иммунизировали в двух независимых экспериментах введением трех доз определенного варианта ABD, включая контрольный ABD дикого типа (ABDwt), три варианта связывания VRC01 VRA017, VRA019 и VRA177 и укороченную версию VRA017S. Каждая отдельная группа состоит из 5 животных. После иммунизации собирали сыворотку и мультимеризованные Clade B рекомбинантные варианты Env (gp120 MBL) без какой-либо очистки и идентификационных меток, использовали для тестирования титров Env-специфических сывороточных антител IgM, всех изотипов IgG (IgGtot), IgG1 и IgG2a с помощью ELISA. b) Env-специфические сывороточные IgGtot из эксперимента I. c) Env-специфические сывороточные IgGtot, IgG1, IgG2a и IgM из эксперимента II. Статистическое сравнение проводили с помощью критерия Краскела-Уоллиса ANOVA с посттестом Данна (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

Фигура 8. (a) VRC01 конкурирует с сывороткой иммунизированных мышей за связывание с gp120. Планшеты покрывали gp120. VRC01, серийно разбавленный в блокирующем буфере (в дуплетах), наносили с сывороткой мыши, разбавленной

1:400. После промывки планшеты инкубировали с кроличьим HRP-конъюгированным антимышиным IgG антителом, промывали, проявляли субстратом и измеряли оптическую плотность при 490 нм. Средние значения указаны горизонтальными полосами. (b) Интактную сыворотку, а также антитело 10E8 использовали в качестве отрицательного контроля.

Фигура 9. Кривые титрования смешанных сывороток мышей во время анализа нейтрализации псевдовируса ВИЧ-1. Анализы нейтрализации проводили с использованием набора псевдовирусов ВИЧ-1 Clade B и C уровня 2 или 3 с индикаторными клетками TZM-bl. Серийно разбавленные образцы сыворотки в дубликатах инкубировали с псевдовирусами. Нагрузку псевдовирусами устанавливали для достижения примерно 150 000 RLU в 150 мкл DMEM при отсутствии сыворотки. После инкубации добавляли клетки TZM-bl с плотностью 10^5 клеток/мл, инкубировали, лизировали, добавляли субстрат и измеряли люминесценцию. На участках (а), (б), (в) показаны кривые титрования конкретных псевдовирусов и сывороток мышей отдельных иммунизируемых групп.

Фигура 10. Анализ термостабильности белков VRA017S, VRA019S и VRA177S с использованием анализа теплового сдвига (TSA). Показаны нормированные кривые флуоресценции термического плавления белков, связывающих His₆-VRA-TolS-AVI (слева), и первая производная флуоресценции в зависимости от температуры (справа). Температура плавления указана как самая нижняя точка пунктирной кривой. Измерение проводили в дубликатах и усредняли. Определенные температуры плавления (T_m) для белков, связывающих VRA017S, VRA019S и VRA177S, соответствуют T_m 50°C, 50°C и 58,5°C соответственно. T_m для родительского немутированного слитого белка His₆-ABDwt-TolS-AVI составляет 55,5°C (пунктирная линия).

Примеры осуществления изобретения

Материалы и методы

Конструирование и производство рекомбинантного gp120

Мультимерный рекомбинантный белок gp120 «Clade B» с N-концевой His-меткой и C-концевой V5-меткой получали с использованием протокола, описанного

панее (Raska M, Takahashi K, Czernekova L, et al Glycosylation patterns of HIV-1 gp120 depend on the type of expressing cells and affect antibody recognition. *The Journal of biological chemistry* 2010, 285: 20860-9; Raska M, Moldoveanu Z, Novak J, et al Delivery of DNA HIV-1 vaccine to the liver induces high and long-lasting humoral immune responses. *Vaccine* 2008, **26**: 1541-51; Raska M, Czernekova L, Moldoveanu Z, et al Differential glycosylation of envelope gp120 is associated with differential recognition of HIV-1 by virus-specific antibodies and cell infection. *AIDS Res Ther* 2014, 11: 23) в концентрации 1,2 мг/мл. Этот белок использовали для анализа конкуренции с белками VRA.

Антитела, используемые для предварительной селекции, селекции и дальнейшей характеристики

Широконейтрализующее человеческое gp120 моноклональное антитело VRC01 (RRID: AB_2491019) получали от доктора Джона Масколы (номер по каталогу 12033) (Wu X, Yang ZY, Li Y, et al. Rational Design of Envelope Identities Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibodies to HIV-1. *Science* 2010, 329: 856-61) через Программу реагентов NIH AIDS, Отделение AIDS, NIAID, NIH. Fab-фрагмент VRC01 готовили с использованием набора Fab Micro Preparation (Pierce, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) в соответствии с инструкциями производителя. 125 мкл антитела VRC01 (100 мкг) наносили на колонку, содержащую уравновешенный иммобилизованный папаин, и инкубировали в течение 5 часов при 37°C. Расщепленное антитело элюировали центрифугированием и добавляли в колонку с уравновешенным иммобилизованным белком А. Колонку центрифугировали для сбора фрагмента Fab. Измеряли концентрацию очищенного Fab-фрагмента. Белок VRC01 IgG, а также его Fab тестировали на его активность в отношении связывания gp120 при иммобилизации на планшете Polysorp (NUNC, Roskilde, Дания) в ELISA. Человеческий IgG карпа 1 мг/мл (очищенный белок миеломы, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) использовали в качестве отрицательного контроля в ELISA, а также в качестве изотипического контроля для предварительной селекции в рибосомном дисплее, хранили как 1 мг/мл исходного раствора при -20°C. VRC01 mAb

использовали для рибосомного дисплея в качестве целевого белка, хранящегося в виде исходного раствора 3 мг/мл в PBS (pH 7,2) при -80°C.

Сборка библиотеки ABD и селекция рибосомного дисплея

Комбинаторную библиотеку, полученную из ABD, собирали с помощью ПЦР (Ahmad JN, Li J, Biedermannova L, et al Novel high-affinity binders of human interferon gamma derived from albumin-binding domain of protein G. *Proteins* 2012, 80: 774-89) и использовали для трансляции *in vitro* и дальнейшей селекции рибосомных дисплеев (Kuchar M, Vankova L, Petrokova H, et al Human interleukin-23 receptor antagonists derived from an albumin-binding domain scaffold inhibit IL-23-dependent *ex vivo* expansion of IL-17-producing T-cells. *Proteins* 2014, 82: 975-89). Проводили трех- и пятираундовую селекцию RD, 96-луночные планшеты Polysorp (NUNC) покрывали VRC01 IgG, разбавленным в 100 мМ растворе бикарбоната/карбоната для покрытия (pH 9,6) в концентрации в соответствии с отрегулированной строгостью в каждом раунде процедуры селекции рибосомного дисплея: 1-й раунд - 50 мкг/мл, 2-й раунд - 25 мкг/мл, 3-й раунд - 10 мкг/мл, 4-й раунд - 5 мкг/мл и 5-й раунд - 5 мкг/мл. Процедуру предварительной селекции проводили в лунках, покрытых человеческим IgG1 kappa антителом (Sigma-Aldrich) в постоянной концентрации 25 мкг/мл в каждом раунде. Конечную кДНК после третьего и пятого раундов селекции амплифицировали с помощью ПЦР и вводили в вектор pET-28b, несущий клонированную tolA-AviTag последовательность (Krizova L, Kuchar M, Petrokova H, et al p19-targeted ABD-derived protein variants inhibit IL-23 binding and exert suppressive control over IL-23-stimulated expansion of primary human IL-17+ T-cells. *Autoimmunity* 2017, 50: 102-13) и вводили в клетки-хозяева *E. coli* XL1 blue.

Производство вариантов белков, полученных из ABD

Варианты белков получали в виде слитых рекомбинантных белков His₆-VRA-TolA-AVI, позволяющих биотинилировать *in vivo* связывающие белки на С-конце (Krizova L, Kuchar M, Petrokova H, et al. p19-targeted ABD-derived protein variants inhibit IL-23 binding and exert suppressive control over IL-23-stimulated expansion of primary human IL-17+ T-cells. *Autoimmunity* 2017, 50: 102-13). Укороченные слитые

белки VRA были сконструированы путем замены полноразмерного *tolA* (инвентарный номер UniProt: P19934, эталонная последовательность NCBI: NC_000913.3) с его С-концевой частью, называемой *tolS*, посредством ПЦР с праймерами

tolA-C-end 5'-ATTAGGATCCCCGTCAGGGCCGATATCAATAACTATGC-3' (SEQ ID NO: 9) и *tolA*-AVI_rev1 5'-TTTCCGCTCGAGCTATTCGTGCCATTCGATTTTGAGCCTCGAAGATGTCGTTCAGGCCCGGTTTGAAGTCCAATGGCGC-3' (SEQ ID NO: 10). Связывающие белки VRA получали в виде *in vivo* биотинилированных белков в штамме BirA *E. coli* BL21 (DE3) с добавлением 50 мкМ d-биотина (приготовленный 5 мМ раствор в 10 мМ бициновом буфере, pH 8,3) в среде LB, содержащей канамицин (60 мкг/мл) и хлорамфеникол (30 мкг/мл). Продукцию белка индуцировали при 35°C 1,5 мМ IPTG после того, как культура достигла плотности OD₆₀₀ = 0,6. Клетки собирали через 4 часа после индукции, обрабатывали ультразвуком в TN буфере (50 мМ Трис, 150 мМ NaCl, pH 8,0), центрифугировали (40 000×g, 20 мин, 4°C) и в дальнейшем бактериальные лизаты анализировали или белки очищали на колонке с Ni-NTA агарозой.

Скрининг вариантов ABD с помощью ELISA

Клеточные лизаты клонов клеток-хозяев *E. coli* BL21 BirA, продуцирующих биотинилированные варианты белка, готовили с использованием раствора лизоцима (PBS буфер, 0,05% Tween, 1% лизоцим, 25 ед/мл бензоназы, pH 7,4) или с использованием ультразвукового аппарата (Misonix 3000). Планшет Polysorp (NUNC, Roskilde, Дания) покрывали VRC01 IgG1 (5 мкг/мл) или IgG1 каппа (5 мкг/мл) в покрывающем буфере (100 мМ бикарбонат/карбонатный буфер, pH 9,6) при 7°C в течение ночи. На следующий день планшет промывали раствором PBST (буфер PBS, содержащий 0,05% Tween, pH 7,4) и лунки блокировали PBSTB (буфер PBS, pH 7,4, содержащий 0,05% Tween и 1% BSA). Наносили образцы лизата (разбавленные в 33 раза), очищенные варианты белка, а также отрицательный контроль ABDwt, разбавленный в PBSTB, и их связывание определяли с использованием конъюгата стрептавидина Poly-HRP (Pierce), разбавленного в

PBSTB 1:10 000. Меченный V5 рекомбинантный белок gp120 разбавляли в PBSTB и обнаруживали с помощью анти-V5 метки - HRP конъюгата в PBSTB (1:10 000). Связывание белка визуализировали ферментативной реакцией HRP с субстратом OPD (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) в цитратном буфере (3,31% дигидрат трехосновного цитрата натрия, фосфорная кислота, pH 5,0) или в субстрате TMB-Complete 2 (TestLine Clinical Diagnostics sro, Брно, Чешская Республика) и реакцию останавливали 2 М серной кислотой и измеряли оптическую плотность при 492 или 450 нм соответственно. С помощью этого метода было проверено почти 800 лизатов бактериальных клонов и обнаружено четыре варианта, которые преимущественно связываются с широконейтрализующим антителом VRC01 по сравнению с контрольным изотипическим антителом IgG kappa (Фиг. 2). Эти связывающие белки были обозначены как VRA белки. Варианты VRA017 (SEQ ID NO. 6) и VRA019 (SEQ ID NO. 7) получали при пятираундовой селекции рибосомного дисплея (RD), тогда как варианты VRA174 и VRA177 были обнаружены при трехраундовой RD-селекции. Анализ последовательности ДНК выявил идентичность последовательностей вариантов VRA174 и VRA177, и поэтому для дальнейшего анализа использовали только клон VRA177 (SEQ ID NO. 8) (Таблица 1, Фиг. 3). Этот метод в дальнейшем использовали для проверки специфического связывания белков VRA017, VRA019 и VRA177 с иммобилизованным нейтрализующим антителом VRC01 (Фиг. 4а), а также с иммобилизованным Fab-фрагментом VRC01 IgG (Фиг. 4б) по сравнению со связыванием с контролем изотипа IgG kappa.

Конкуренция ELISA

Лунки планшета Polysorp (NUNC, Дания) покрывали VRC01 IgG антителом или Fab-фрагментом, разбавленным в покрывающем буфере (5 мкг/мл). Покрытые лунки блокировали PBSTB раствором и наносили меченный V5 gp120 в качестве серийно разбавленного конкурента в PBSTB растворе, содержащем вариант белка VRA при постоянной концентрации (5 мкг/мл) и связывающие биотинилированные *in vivo* VRA017, VRA019 и VRA177 (как слитый белок His6-VRA-TolA-AVI) выявляли с помощью конъюгата стрептавидин-HRP. В качестве альтернативы, VRA017 белок

наносили в качестве серийно разбавленного конкурента в PBSTB при постоянной концентрации меченого V5 gp120 (1,2 мкг/мл), и определение связанного gp120 проводили с использованием конъюгата анти-V5 метка - HRP-антитело. Результаты визуализировали ферментативной реакцией HRP с OPD субстратом (Sigma-Aldrich, MO) в цитратном буфере или TMB-Complete 2 субстратом (TestLine Clinical Diagnostics sro, Брно), и реакцию останавливали 2 М серной кислотой и абсорбцией при 492 или 450 нм соответственно. Этот метод использовали для демонстрации результатов, в которых увеличение количества гликопротеина gp120 ингибирует связывание VRA017, VRA019 и VRA177 с иммобилизованным VRC01 IgG, а также с Fab-фрагментом, полученным расщеплением VRC01 IgG (Фиг. 5b). Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что варианты белка VRA017, VRA019 и VRA177 распознают вариабельную область антитела VRC01, поэтому их можно распознать как неродственный эпитоп VRC01. Более того, конкуренция за связывание между VRA017 и gp120 также подтверждается другим экспериментом, подтверждающим, что увеличение концентрации VRA017 приводит к ингибированию связывания гликопротеина gp120 с иммобилизованным VRC01 IgG, а также с его Fab-фрагментом (Фиг. 6).

Анализ последовательности выбранных вариантов

Секвенировали плазмидную ДНК, кодирующую полноразмерные варианты белка (Основное учреждение - Геномика, Факультет естественных наук, Карлов университет, BIOCEV, Vestec). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей проводили с использованием NCBI BLAST (Национальный центр биотехнологической информации, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Проанализировали несколько десятков отобранных клонов, и наиболее важные из них представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей связывающих VRA белков и родительского ABDwt. Серые прямоугольники указывают 11 позиций, в которых были рандомизированы ABD аминокислоты в области 20-46.

	20	24	27	29 30	32 33	36 37	40	44																			
ABDwt	Y	Y	K	N	L	I	N	N	A	K	T	V	E	G	V	K	A	L	I	D	E	I	L	A	A	L	P
VRA017	A	Y	K	N	A	I	N	R	A	V	T	V	G	L	V	K	R	V	I	D	G	I	L	A	R	L	P
VRA019	N	Y	K	N	R	I	N	V	A	L	G	G	T	A	V	K	R	I	I	D	A	I	L	A	A	L	P
VRA174	R	Y	K	N	D	I	N	P	A	S	R	V	G	A	V	K	R	V	I	D	R	I	L	A	G	L	P
VRA177	R	Y	K	N	D	I	N	P	A	S	R	V	G	A	V	K	R	V	I	D	R	I	L	A	G	L	P

Иммунизация экспериментальных мышей

Все эксперименты проводили на самках мышей BALB/c в возрасте от 6 до 8 недель, приобретенных в AnLab (Брно, Чехия) в стандартных условиях содержания в соответствии с рекомендациями ARRIVE. Эксперименты по вакцинации были одобрены Комитетом по этике факультета медицины и стоматологии (Университет Палацкого в Оломоуце, Чешская Республика) и Министерством образования, молодежи и спорта, Чешская Республика (MSMT-15434/2015-7). Образцы предиммунной сыворотки (130 мкл на животное) получали с использованием метода сбора образцов крови из хвостовой вены. Каждую мышь иммунизировали три раза соответствующим вариантом ABD/VRA. Были проведены два независимых эксперимента по иммунизации. В первом эксперименте использовали варианты VRA017, VRA019 и VRA177 и ABD дикого типа (ABDwt) для оценки иммуногенности и специфичности полученных антител из мышинной сыворотки. Результаты представлены на Фигуре 7а, b. Во втором эксперименте (Фигура 7а, c) тестировали VRA017, VRA177 и укороченную версию белка VRA017, обозначенную как VRA017S, с укороченным С-концевым сегментом TolS-AVI, который позволяет сузить очаг иммунного ответа на VRC01-подобный эпитоп или контроль ABDwt. Все иммунизации проводили внутрикожно равными дозами 20 мкг варианта ABD/VRA (разбавленного в 50 мкл стерильного PBS) на мышь на одну иммунизацию, смешанного 1:1 (объем : объем) с адъювантом Фрейнда. Наши результаты подтвердили, что иммунизация мышей белками VRA приводит к выработке антител против протестированных вариантов белков VRA и что сыворотка мышей, иммунизированных вариантами VRA, значительно нацелена на gp120 по сравнению с контрольной сывороткой неиммунизированных животных или

индивидуумов, иммунизированных контрольным белком ABD. Это показывает, что поверхность отдельных вариантов VRA демонстрирует существенную комплементарность формы паратопу нейтрализующего антитела VRC01 и, таким образом, может имитировать часть гликопротеина Env ВИЧ-1.

Определение Env-специфических сывороточных антител с помощью ELISA

Для определения реактивности сыворотки мышей с Env ВИЧ-1 в ELISA использовали рекомбинантный тримерный Clade B gp120 MBL без меток для обнаружения или очистки. Планшеты Maxisorp (NUNC, Roskilde, Дания) покрывали gp120 MBL (50 нг/лунка) в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали и блокировали 1% BSA/PBS/Tween20 на 3 часа при комнатной температуре. Сыворотки серийно разбавляли (начиная с разбавления 1:100) в блокирующем буфере (в дубликатах) и инкубировали в течение ночи при 4°C, чтобы определить одно разбавление, соответствующее линейной пропорции кривых титрования, полученных от большинства иммунизированных VRA животных в итоговом сравнении. Окончательное разбавление сыворотки устанавливали на 1:400. Для обнаружения связанных антител, специфичных к gp120, планшеты промывали и инкубировали с кроличьими антимышиными IgG, IgG1, IgG2a и вторичными антителами IgM, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США), разбавленными в блокирующем буфере в течение 3 часов при комнатной температуре. Сигнал проявлялся с субстратом О-фенилендиамин- H_2O_2 . Реакцию останавливали 1 М серной кислотой и измеряли оптическую плотность при 492 нм. Эту методическую процедуру использовали для получения результатов, показанных на Фигуре 7с. Представленные данные показывают, что сыворотки мышей, иммунизированных белками VRA017 и VRA177, имеют значительно повышенное связывание с тримерной версией рекомбинантного гликопротеина gp120 для IgG1, IgG2a и общего IgG, в то время как антитела IgM не связываются с gp120.

Конкуренция VRC01 с сывороткой гипериммунных мышей за связывание gp120, проверенная с помощью ELISA

Планшеты покрывали, как описано выше, для определения Env-специфических сывороточных антител с помощью ELISA. VRC01, серийно разбавленный в блокирующем буфере (в дуплетах), наносили с сывороткой мыши, разбавленной 1:400. Для обнаружения связанных мышиных антител планшеты промывали и инкубировали с кроличьим антимышиным IgG вторичного антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена, разбавленной в блокирующем буфере, в течение 3 часов при комнатной температуре. Планшеты обрабатывали и измеряли, как указано выше. Эту экспериментальную процедуру выполняли для получения результатов, показанных на Фигуре 8а. Эти результаты показывают, что увеличивающаяся концентрация нейтрализующего антитела VRC01 блокирует связывание разбавленной сыворотки мышей, иммунизированных VRA177, VRA017S и VRA017, с иммобилизованным gp120. Это подтверждает конкуренцию моноклонального антитела VRC01 с вновь продуцируемыми сывороточными антителами против VRA и подчеркивает специфичность вновь продуцируемых сывороточных антител против gp120 ВИЧ-1. Это открытие дополнительно подтверждается неспособностью контрольного gp120-нерелевантного Env антитела 10E8 конкурировать за связывание с сывороткой иммунизированных мышей (Фиг. 8b).

Анализ на нейтрализацию вируса

Анализ на нейтрализацию проводили с использованием различных псевдовирусов из clade B и clade C, продуцируемых в клеточной линии HEK293/17. Клетки с конфлюэнтностью 60-90% в колбе для культивирования объемом 75 см² котрансфицировали с использованием реагента для трансфекции FuGene6 (Promega, Madison, WI). Перед трансфекцией 8 мкг плазмиды pSG3deltaEnv, 4 мкг кодирующей Env плазмиды и 48 мкл FuGene6 смешивали с культуральной средой DMEM в общем объеме 800 мкл и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Затем смесь добавляли к 12 мл RPMI-1640 в колбу с лунками. Через 2 дня культуральную среду с продуцированными псевдовирусами собирали,

разделяли на аликвоты и хранили при -80°C до использования. Анализ на нейтрализацию проводили с использованием клеточной линии TZM-bl, стабильно экспрессирующей рецептор CD4, корецепторов CCR5 и CXCR4 и содержащей гены люциферазы и β -галактозидазы под контролем промотора длинных концевых повторов ВИЧ-1 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH). Серийно разбавленные образцы сыворотки в дубликатах инкубировали с псевдовиром примерно при 150 000 RLU в 150 мкл DMEM. После 90-минутной инкубации при 37°C добавляли 100 мкл клеток плотностью 10^5 клеток/мл. Планшет инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение 48 часов. Затем удаляли 150 мкл культуральной среды и добавляли 100 мкл лизирующего буфера, содержащего люциферин (Promega). Через 2 минуты 100 мкл лизированных клеток переносили в черные 96-луночные планшеты и измеряли люминесценцию с помощью HP-люминометра. Эту методическую процедуру использовали для получения набора результатов нейтрализации, обобщенных в Таблице 2. Наши результаты показывают, что сыворотки мышей, иммунизированных белками VRA177 и VRA017, проявляют нейтрализующую активность, которая представлена на наборе из 13 подготовленных псевдовирусов ВИЧ. Сыворотка мышей варианта VRA177 блокировала связывание 5 типов псевдовирусов с индикаторными клетками человека, тогда как сыворотка мышей, иммунизированных VRA017, блокировала связывание только 2 типов псевдовирусов. Наилучшая нейтрализующая активность была достигнута при комбинированной иммунизации VRA177ToIA и VRA017S, вызывающей высокие титры сывороточных антител, блокирующих связывание 8 из 13 протестированных псевдовирусов. Подробные кривые связывания сывороток гипериммунных и интактных мышей для каждого типа псевдовируса показаны на Фигуре 9a,b,c. Обобщенные комбинированные данные показывают, что полученные связывающие белки VRA177, VRA017 и VRA017S обладают способностью имитировать эпитоп нейтрализующего антитела VRC01, поскольку их использование для иммунизации животных вызывало продукцию антител, специфичных к gp120/Env ВИЧ-1, за счет индуцированной антиген-имитирующей способности. Нейтрализующий потенциал сывороточных антител, индуцированных

белками VRA, свидетельствует о перспективности использования этих уникальных белков-имитаторов для разработки профилактической вакцины против ВИЧ и для индукции защиты от развития СПИДа.

Таблица 2. Нейтрализация псевдовирусов ВИЧ-1 сывороткой мышей, иммунизированных в эксперименте II.

Кратность разбавления сыворотки приводило к 50% нейтрализации псевдовирусов							
Псевдовирус		Ряд	преимунный (интактный)	ABDwt	VRA177	VRA177 +VRA017S +VRA017S	VRA017
HIV-1 Clade B	pWITO	2B	<30	<30	<30	<30	<30
	pREJO	2B	<30	<30	31	61	<30
	AC10.0	2B	<30	<30	<30	48	<30
	TRO	2B	<30	<30	<30	37	<30
	SC						
	422664	2B	<30	<30	57	71	34
	pRHPA	2B	<30	<30	84	90	40
	PVO	3B	<30	<30	<30	<30	<30
HIV-1 Clade C	Du422	2C	<30	<30	<30	<30	<30
	Du172	2C	<30	<30	<30	<30	<30
	Du156	2C	<30	<30	34	65	<30
	ZM53M	2C	<30	<30	32	87	<30
	ZM214	2C	<30	<30	<30	32	<30
	CAP210.2	2C	<30	<30	<30	<30	<30

Результаты выражены как кратность разбавления сыворотки, которое привело к 50% нейтрализации вируса.

Определение стабильности белка с помощью анализа теплового сдвига на основе флуоресценции

Образцы белка (0,2 мг/мл) в ФСБ и красителе 5xSypro Orange (Sigma-Aldrich) смешивали в общем объеме 25 мкл и измеряли с использованием системы обнаружения ПЦР в режиме реального времени CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), как описано ранее (Kuchar M, Vankova L, Petrokova H, et al. Human

interleukin-23 receptor antagonists derived from an albumin-binding domain scaffold inhibit IL-23-dependent ex vivo expansion of IL-17-producing T-cells. *Proteins* 2014, 82: 975-89). Термическая стабильность белков VRA017S, VRA019S и VRA177S показана на Фигуре 10 с определенной температурой плавления (T_m) 50°C для VRA017S и VRA019S и 58,5°C в случае VRA177S. Температура плавления исходного немутированного слитого белка His6-ABDwt-TolS-AVI составляет 55,5 °C (пунктирная линия). Результаты показывают, что замена аминокислот в рандомизированных положениях домена ABD значительно не нарушала температурную стабильность вариантов белка. Это предполагает, что белки VRA-TolS можно использовать в качестве компонентов при разработке экспериментальных вакцин.

Статистика

Различия между группами и статистическую значимость определяли с помощью дисперсионного анализа (ANOVA), критерия Краскела-Уоллиса и посттеста Данна. Все статистические анализы были выполнены с использованием статистических пакетов SPSS v. 21 (IBM Corp., Армонк, Нью-Йорк) или программного обеспечения GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, Сан-Диего, Калифорния).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, имитирующий эпитоп гликопротеина gp120 ВИЧ-1, распознаваемый паратопом широконейтрализующего антитела VRC01, отличающийся тем, что указанный полипептид имеет длину до 100 аминокислотных остатков и содержит аминокислотную последовательность: X¹YKNX²INX³AX⁴X⁵VX⁶X⁷VKRX⁸IDX⁹ILAX¹⁰LP (SEQ ID NO. 1), в которой:
X¹ выбран из аминокислот A, N, R;
X² выбран из аминокислот A, R, D;
X³ выбран из аминокислот R, V, P;
X⁴ выбран из аминокислот V, L, S;
X⁵ выбран из аминокислот T, G, R;
X⁶ выбран из аминокислот G, T;
X⁷ выбран из аминокислот L, A;
X⁸ выбран из аминокислот V, I;
X⁹ выбран из аминокислот G, A, R;
X¹⁰ выбран из аминокислот R, A, G;
где альфа-спиральная структура связана С-концом или N-концом с указанной последовательностью SEQ ID NO. 1.
2. Полипептид по п.1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность SEQ ID NO. 1 выбрана из группы, включающей:
AYKNAINRAVTVGLVKRVIDGILARLP (SEQ ID NO: 3),
NYKNRINVALGGTAVKRIIDAILAALP (SEQ ID NO: 4),
RYKNDINPASRVGAVKRVIDRILAGLP (SEQ ID NO: 5),
где альфа-спиральная структура связана С-концом или N-концом с указанной последовательностью SEQ ID NO. 1.
3. Полипептид по п.1 или п.2, отличающийся тем, что альфа-спиральная структура представляет собой последовательность LAEAKVLANRELDKYGVSD (SEQ ID NO. 2).
4. Полипептид по п. 3, отличающийся тем, что он содержит последовательность, выбранную из группы, включающей:
LAEAKVLANRELDKYGVSDAYKNAINRAVTVGLVKRVIDGILARLP (SEQ. ID NO.6),
LAEAKVLANRELDKYGVSDNYKNRINVALGGTAVKRIIDAILAALP (SEQ. ID NO.7),
LAEAKVLANRELDKYGVSDRYKNDINPASRVGAVKRVIDRILAGLP (SEQ ID NO:8).
5. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что он содержит метку аффинной очистки и/или детекции.
6. Химерный белок, отличающийся тем, что он содержит
- полипептид по любому из пп. 1-5, и

- спиральный белок TolA или его укороченный вариант TolS, или сывороточный альбумин, или белок теплового шока hsp70.

7. Последовательность ДНК, отличающаяся тем, что она выбрана из группы, включающей комплементарную ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность полипептидов по любому из пп. 1-5, и ДНК, гибридизирующуюся с указанной комплементарной ДНК в условиях с высокой степенью строгости.
8. Применение последовательности ДНК по п. 7 для получения полипептидов или рекомбинантных белков, продуцируемых в клетках-хозяевах бактерий, дрожжей, насекомых, млекопитающих или человека.
9. Клетка-хозяин, отличающаяся тем, что она содержит по меньшей мере одну последовательность ДНК по п. 7.
10. Полипептид по любому из пп.1-5 для применения в медицине, в частности, в качестве активного ингредиента или вспомогательного ингредиента вакцины для профилактики заражения вирусом ВИЧ-1.
11. Применение полипептида по любому из пп.1-5 в качестве антигена для стимуляции нейтрализующих антител, подходящего для разработки вакцины, предотвращающей заражение вирусом ВИЧ-1.
12. ДНК, кодирующая полипептид по любому из пп. 1-5, для применения в качестве активного ингредиента ДНК-вакцины для профилактики заражения вирусом ВИЧ-1.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ, ИЗМЕНЕННАЯ СОГЛАСНО СТ. 34 РСТ И
ПОЛУЧЕННАЯ ИРЕА 15 НОЯБРЯ 2021 Г.

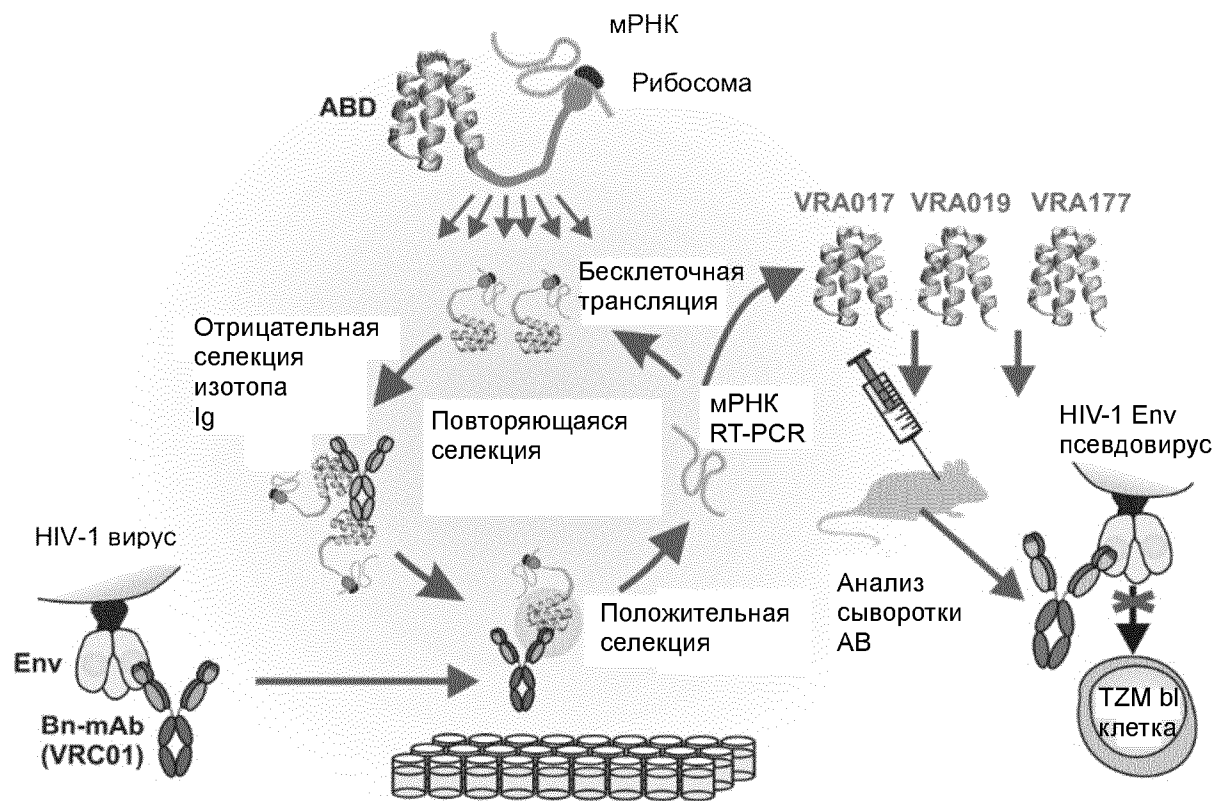
1. Полипептид, имитирующий эпитоп гликопротеина gp120 ВИЧ-1, распознаваемый паратопом широконейтрализующего антитела VRC01, отличающийся тем, что указанный полипептид имеет длину до 60 аминокислотных остатков и содержит аминокислотную последовательность: X¹YKNX²INX³AX⁴X⁵VX⁶X⁷VKRX⁸IDX⁹ILAX¹⁰LP (SEQ ID NO. 1), в которой:
X¹ выбран из аминокислот A, N, R;
X² выбран из аминокислот A, R, D;
X³ выбран из аминокислот R, V, P;
X⁴ выбран из аминокислот V, L, S;
X⁵ выбран из аминокислот T, G, R;
X⁶ выбран из аминокислот G, T;
X⁷ выбран из аминокислот L, A;
X⁸ выбран из аминокислот V, I;
X⁹ выбран из аминокислот G, A, R;
X¹⁰ выбран из аминокислот R, A, G;
где альфа-спиральная структура связана С-концом или N-концом с указанной последовательностью SEQ ID NO. 1.
2. Полипептид по п.1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность SEQ ID NO. 1 выбрана из группы, включающей:
AYKNAINRAVTVGLVKRVIDGILARLP (SEQ ID NO: 3),
NYKNRINVALGGTAVKRIIDAILAALP (SEQ ID NO: 4),
RYKNDINPASRVGAVKRVIDRILAGLP (SEQ ID NO: 5),
где альфа-спиральная структура связана С-концом или N-концом с указанной последовательностью SEQ ID NO. 1.
3. Полипептид по п.1 или п.2, отличающийся тем, что альфа-спиральная структура представляет собой последовательность LAEAKVLANRELDKYGVSD (SEQ ID NO. 2).
4. Полипептид по п. 3, отличающийся тем, что он содержит последовательность, выбранную из группы, включающей:
LAEAKVLANRELDKYGVSDAYKNAINRAVTVGLVKRVIDGILARLP (SEQ. ID NO.6),
LAEAKVLANRELDKYGVSDNYKNRINVALGGTAVKRIIDAILAALP (SEQ. ID NO.7),
LAEAKVLANRELDKYGVSDRYKNDINPASRVGAVKRVIDRILAGLP (SEQ ID NO:8).
5. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что он содержит метку аффинной очистки и/или детекции.
6. Химерный белок, отличающийся тем, что он содержит

- полипептид по любому из пп. 1-5, и
- спиральный белок TolA или его укороченный вариант TolS, или сывороточный альбумин, или белок теплового шока hsp70.

7. Последовательность ДНК, отличающаяся тем, что она выбрана из группы, включающей комплементарную ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность полипептидов по любому из пп. 1-5.
8. Применение последовательности ДНК по п. 7 для получения полипептидов по п.1 в клетках-хозяевах бактерий, дрожжей, насекомых, млекопитающих или человека.
9. Клетка-хозяин, отличающаяся тем, что она содержит по меньшей мере одну последовательность ДНК по п. 7.
10. Полипептид по любому из пп.1-5 для применения в медицине, в частности, в качестве активного ингредиента или вспомогательного ингредиента вакцины для профилактики заражения вирусом ВИЧ-1.
11. Применение полипептида по любому из пп.1-5 в качестве антигена для стимуляции нейтрализующих антител, подходящего для разработки вакцины, предотвращающей заражение вирусом ВИЧ-1.
12. ДНК, кодирующая полипептид по любому из пп. 1-5, для применения в качестве активного ингредиента ДНК-вакцины для профилактики заражения вирусом ВИЧ-1.

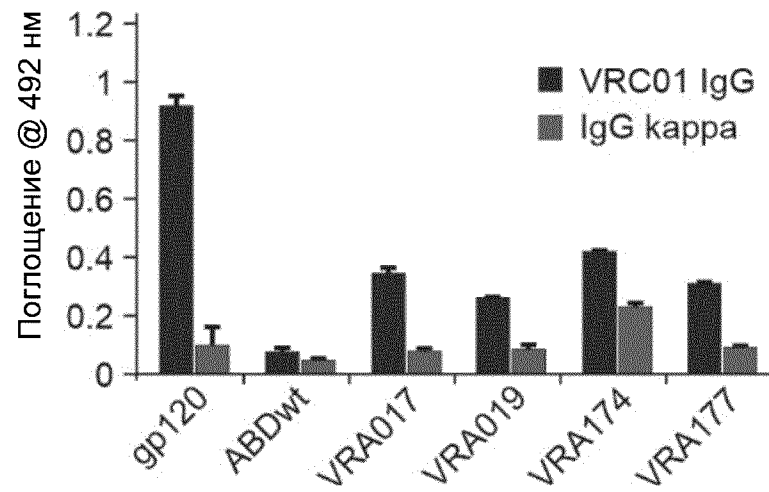
Фиг.1

Рандомизированная библиотека ABD

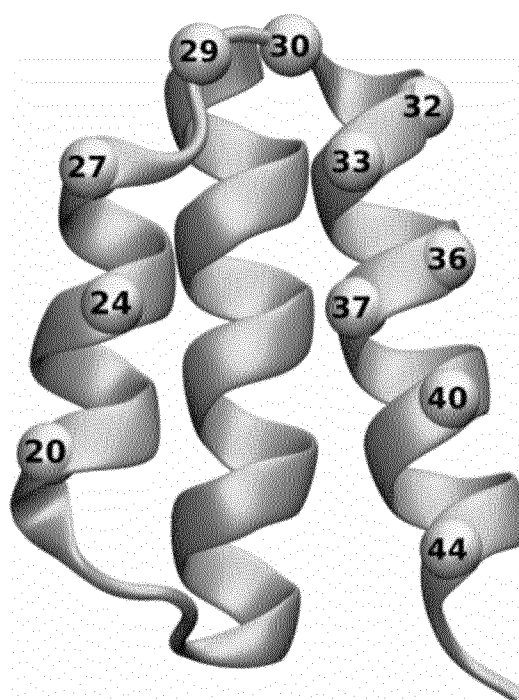


Фиг.2

Скрининг VRC01-специфических вариантов VRA



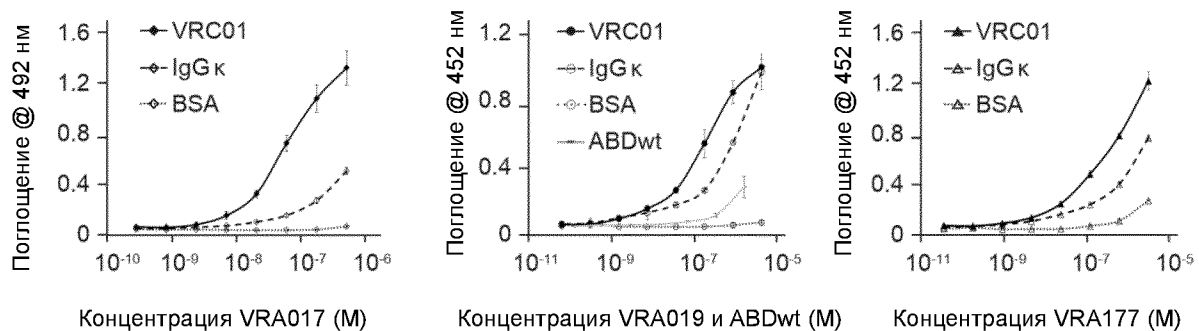
Фиг.3



Фиг.4

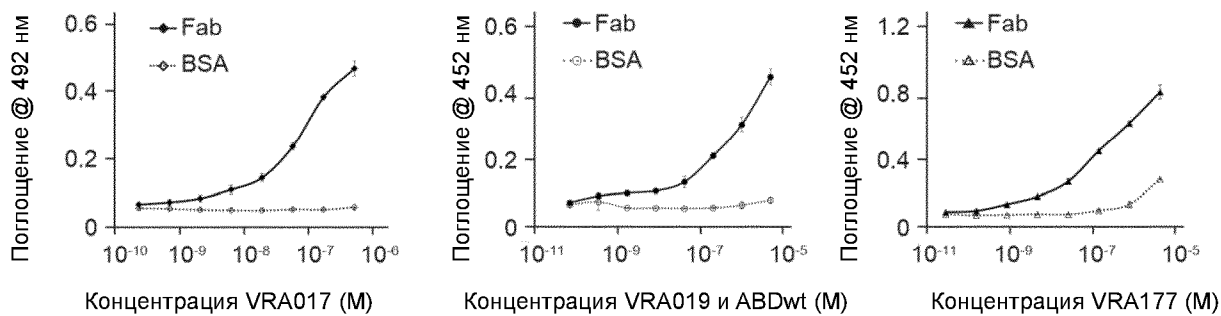
a

Титр VRA017-, VRA019-, и VRA177-ToIA-AVI, связывающихся с VRC01



b

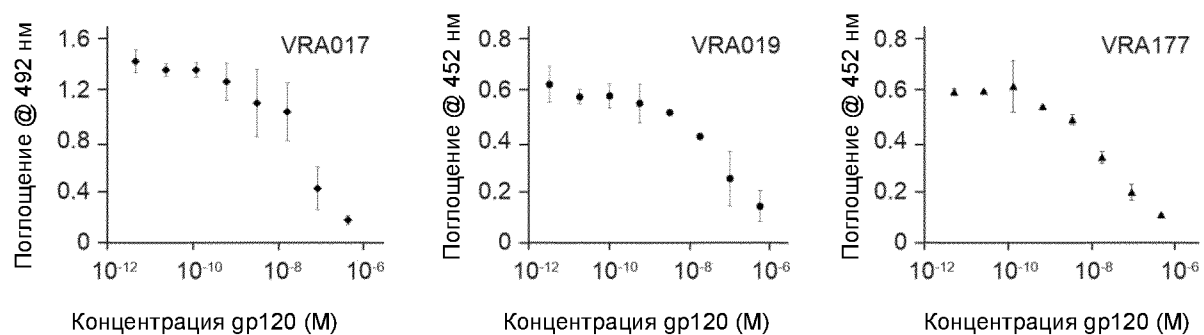
Титр VRA017-, VRA019-, и VRA177-ToIA-AVI, связывающихся с VRC01



Фиг.5

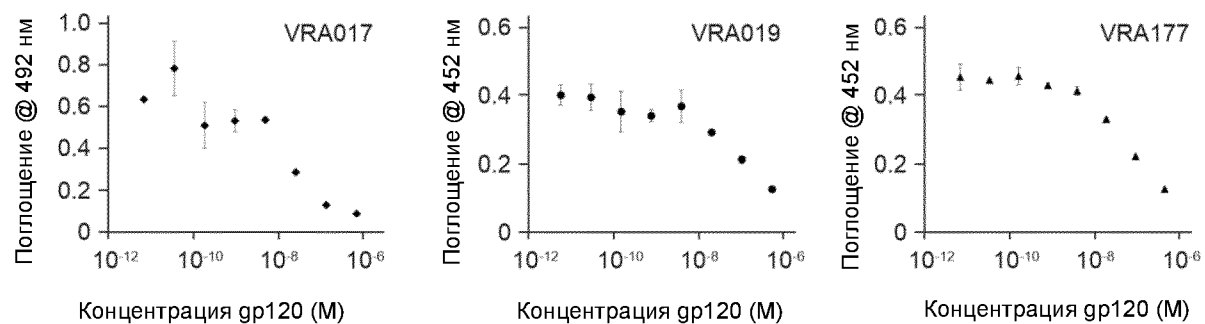
Grp120 конкурирует с VRA017, VRA019 и VRA для 177 VRC01

a

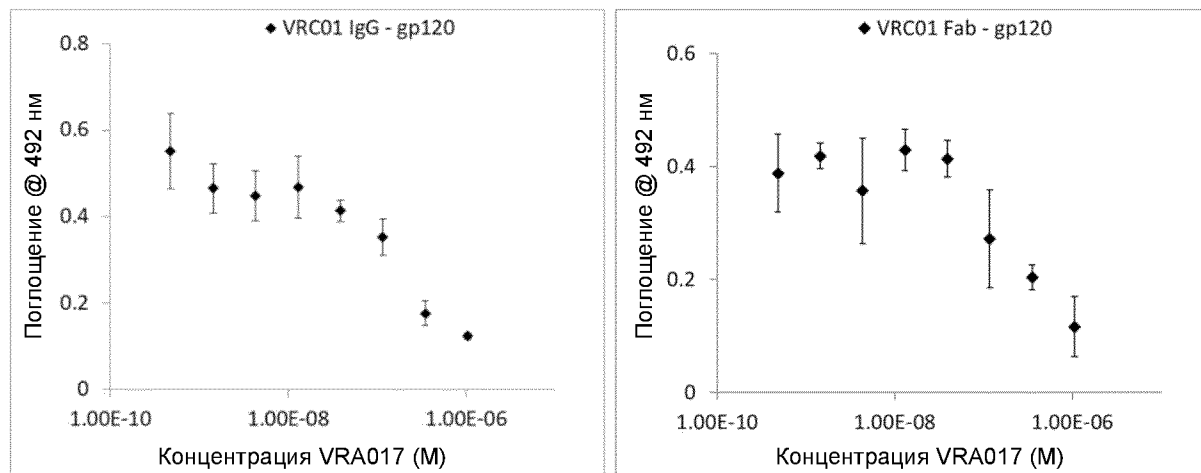


b

Grp120 конкурирует с VRA017, VRA019 и VRA для 177 VRC01 Fab



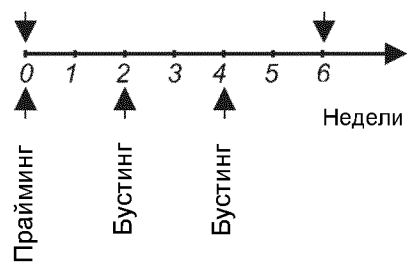
Фиг.6



Фиг.7а

График эксперимента по иммунизации

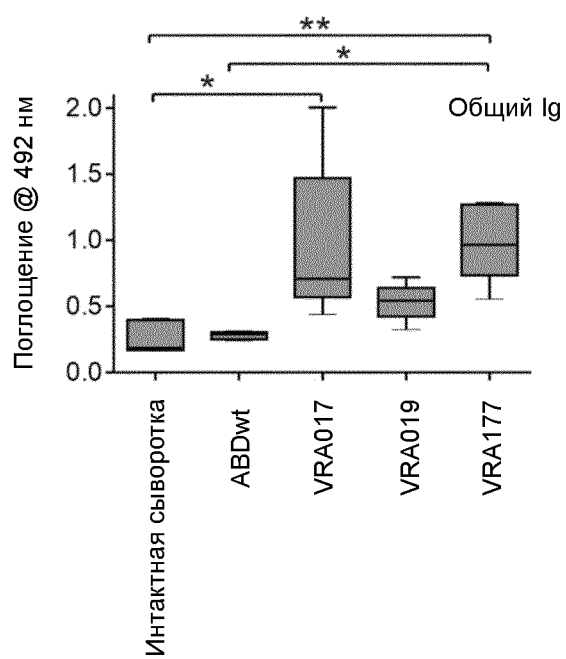
Интактная сыворотка Иммунная сыворотка



Эксперимент	Группа	Прайминг	Буст. I	Буст. II
I	ABDwt	ABDwt	ABDwt	ABDwt
	VRA017	VRA017	VRA017	VRA017
	VRA019	VRA019	VRA019	VRA019
	VRA177	VRA177	VRA177	VRA177
II	ABDwt	ABDwt	ABDwt	ABDwt
	VRA017	VRA017	VRA017	VRA017
	VRA017s	VRA177	VRA017s	VRA017s
	VRA177	VRA177	VRA177	VRA177

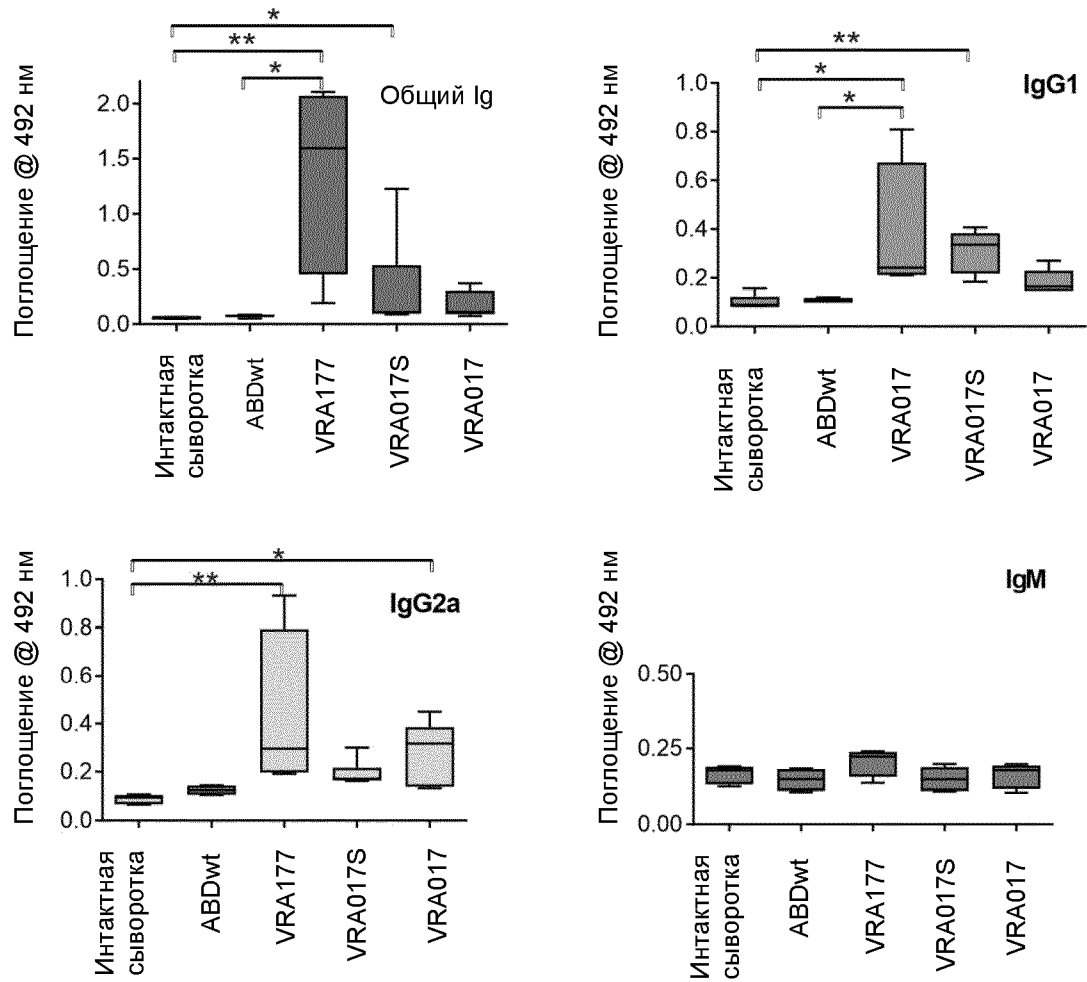
Фиг.7b

Реактивность сыворотки с ggr120 в общем Ig Эксперимента I

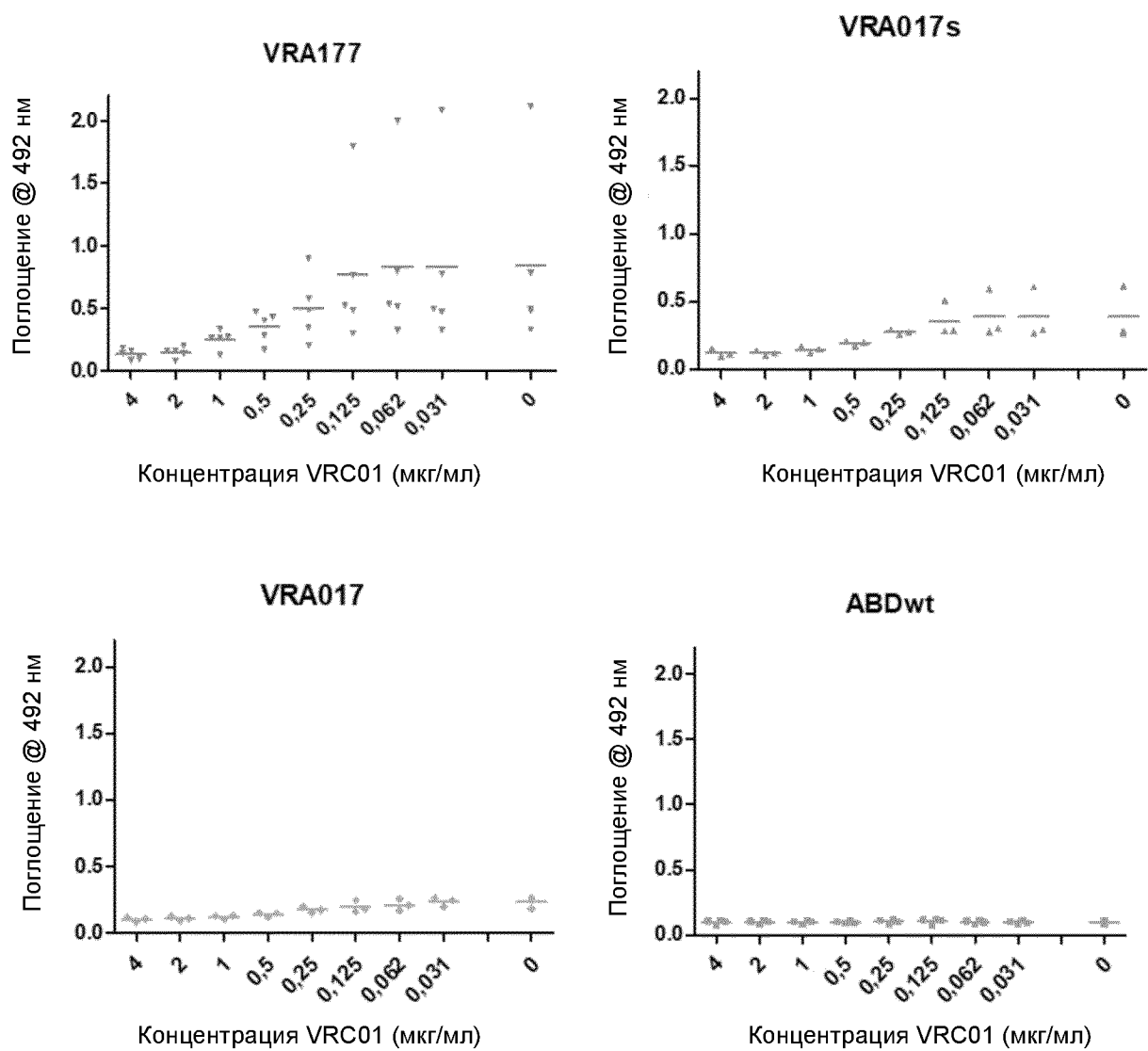


Фиг.7с

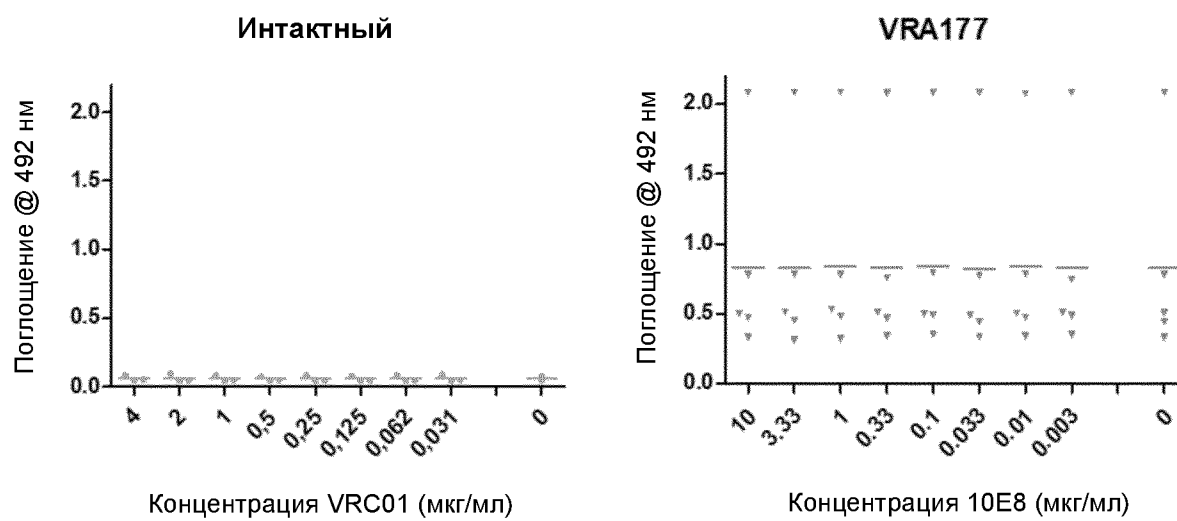
Реактивность сыворотки с gpr120 в общем Ig, IgG1, IgG2a и IgM изотипов Эксперимента II



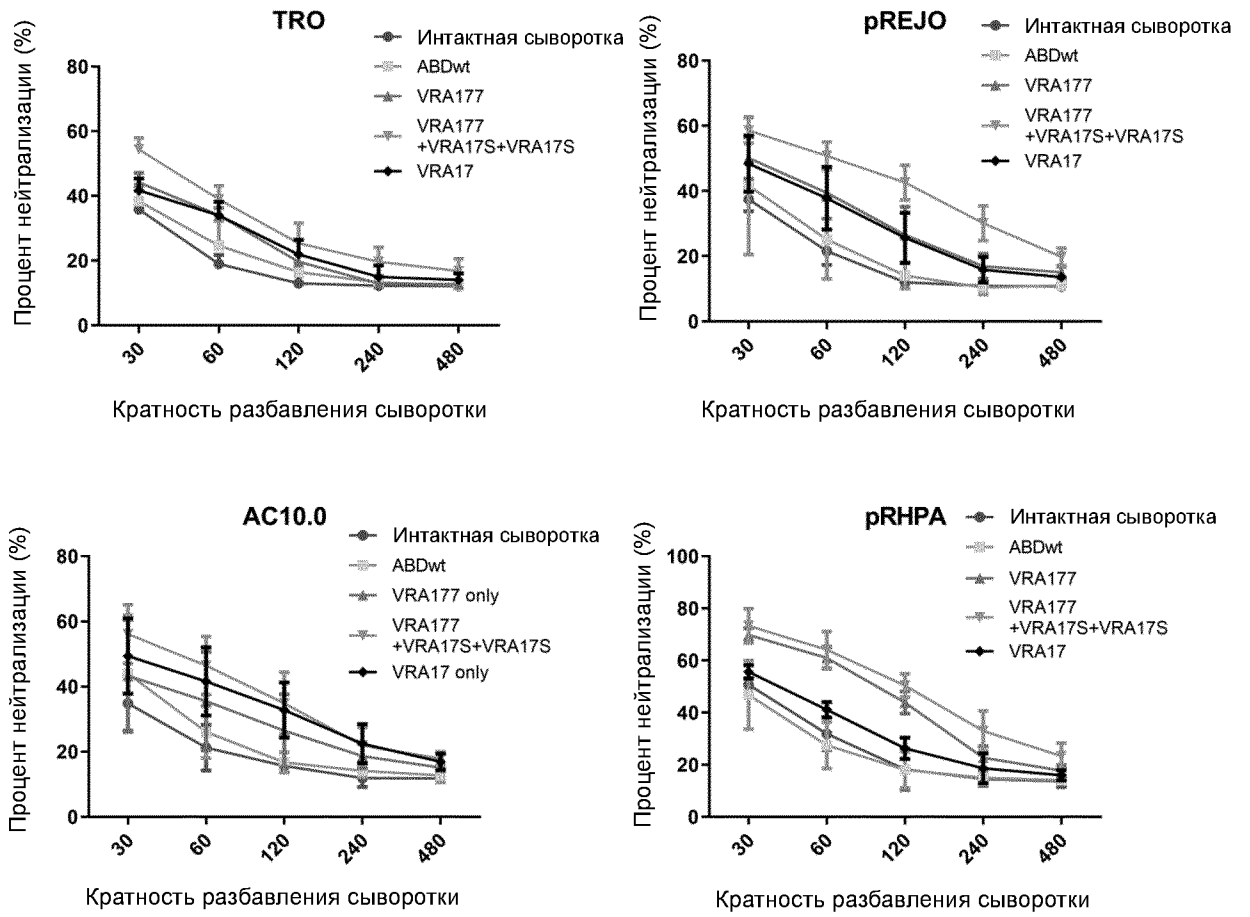
Фиг.8а



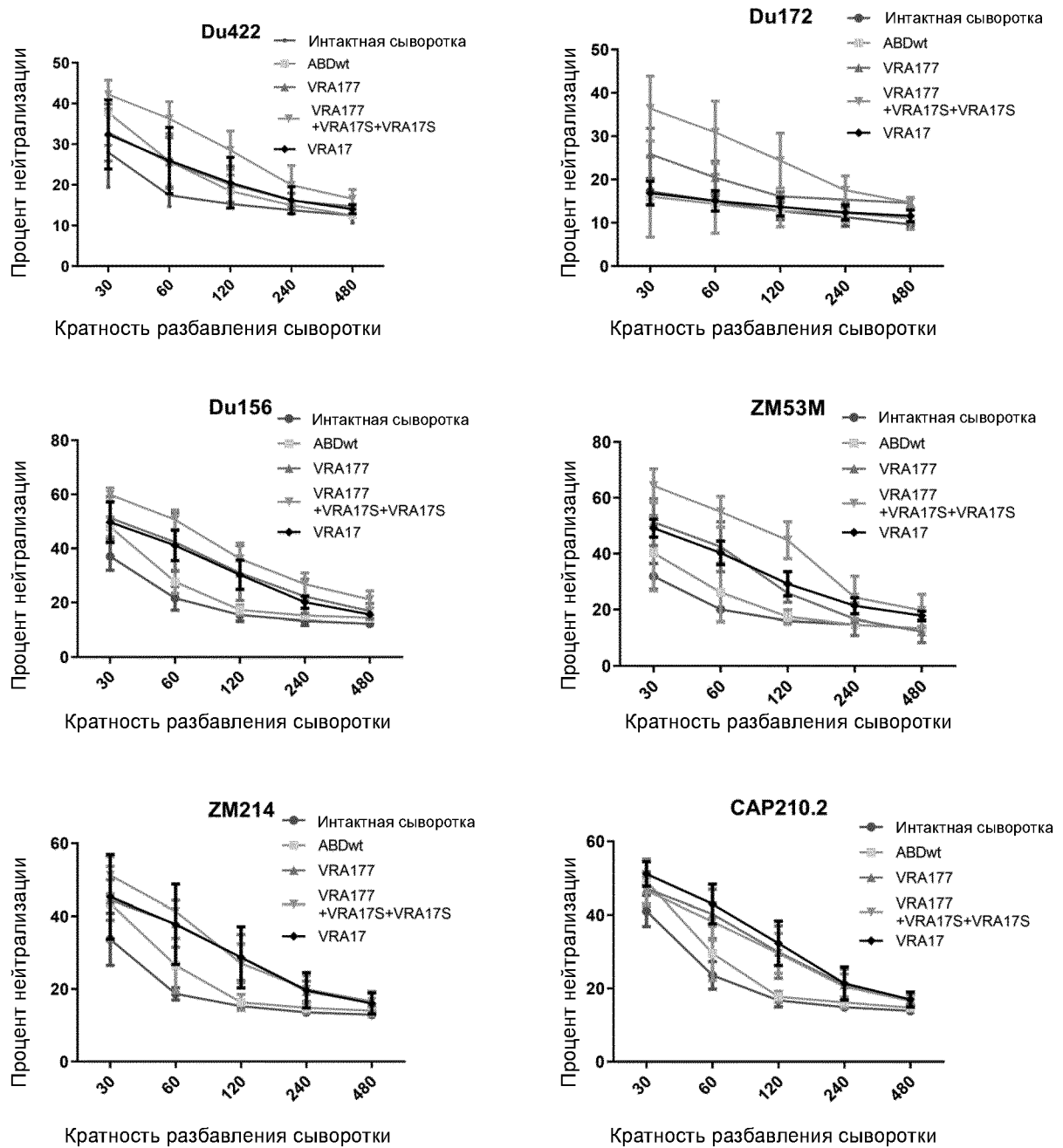
Фиг.8b



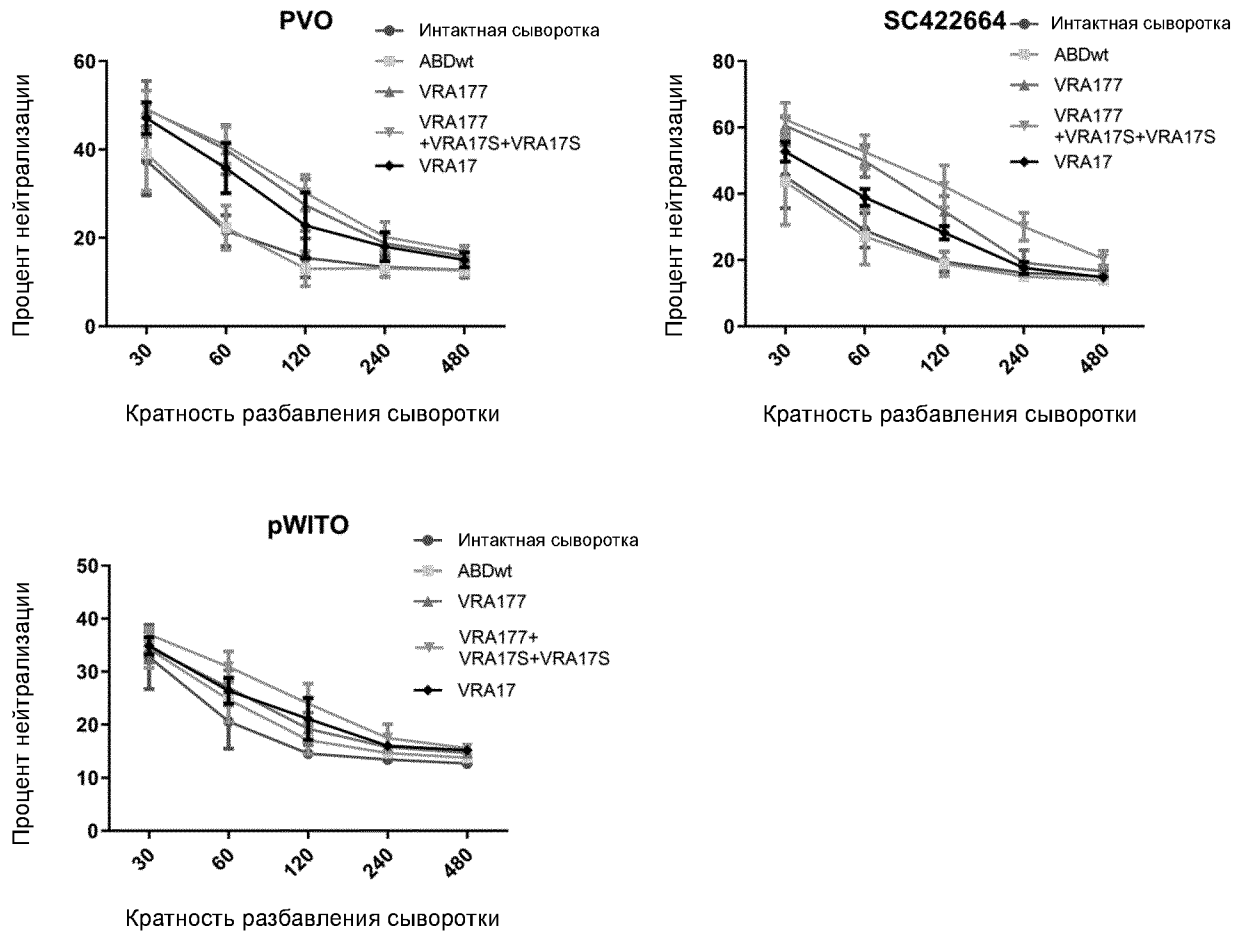
Фиг.9а



Фиг.9b



Фиг.9с



Фиг.10

Термическая стабильность VRA017, VRA019 и VRA177

