

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292189** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.28

(22) Дата подачи заявки
2017.05.01

(51) Int. Cl. *C12N 15/49* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/21 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ, СВЯЗАННЫЕ С ИММУНОГЕНАМИ ВИЧ-1

(31) 62/330,604

(32) 2016.05.02

(33) US

(62) 201892233; 2017.05.01

(71) Заявитель:
**ЗЕ СКРИППС РИСЁРЧ
ИНСТИТУТ (US)**

(72) Изобретатель:

**Кун Леопольд, Уилсон Иэн А., Де
Валь Наталия, Уорд Эндрю Б., Бертон
Деннис, Хэ Линьлин, Чжу Цзян (US)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) В соответствии с настоящим изобретением предложены иммуногены вакцины против ВИЧ-1. Некоторые из иммуногенов содержат полученный из gp140 растворимый белок, который содержит модифицированный N-конец участка HR1 из gp41. Некоторые из иммуногенов содержат полученный из Epr ВИЧ-1 тримерный белок, презентируемый на платформе из 8 наночастиц. В соответствии с настоящим изобретением также предложены способы применения иммуногенов вакцины против ВИЧ-1 для вызова иммунного ответа или лечения ВИЧ-инфекций.

202292189

A1

A1

202292189

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ, СВЯЗАННЫЕ С ИММУНОГЕНАМИ ВИЧ-1

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 [0001] Настоящая заявка на патент испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/330,604 (поданной 2 мая 2016 года). Полное описание приоритетной заявки полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки для всех целей.

ЗАЯВЛЕНИЕ О ПОДДЕРЖКЕ ПРАВИТЕЛЬСТВА

10 [0002] Настоящее изобретение было осуществлено при поддержке правительства согласно грантам AI100663 и AI084817, выданным Национальными институтами здоровья США. Правительство обладает определенными правами на настоящее изобретение.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

15 [0003] Вирус иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) является первичной причиной синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИДа), который считают одной из основных мировых проблем здравоохранения. ВИЧ-1 представляет собой РНК-вирус из семейства Retroviridae. Геном ВИЧ-1 кодирует по меньшей мере
20 девять белков, которые подразделяют на три класса: основные структурные белки Gag, Pol и Env, регуляторные белки Tat и Rev и вспомогательные белки Vpr, Vpg, Vif и Nef. ВИЧ-1 можно подразделить на несколько различных клад, например, А, В, С, D, Е, F, G, H, J и К, распространенность которых в мире варьирует. Каждая клада включает различные штаммы ВИЧ-1, которые были сгруппированы на
25 основании их генетического подобия.

[0004] Начальная фаза репликативного цикла ВИЧ-1 включает присоединение вируса к чувствительным клеткам-хозяевам с последующим слиянием вирусной и
клеточной мембран. Данные события опосредованы внешними гликобелками оболочки вируса, которые изначально синтезируются в виде неспособного к
30 слиянию предшественника гликопротеина оболочки (Env), известного как gp160. Генетическое разнообразие ВИЧ-1 чрезвычайно усложняет разработку эффективной вакцины против штаммов из множества клад ВИЧ-1. В течение

последних двух десятилетий прилагались колоссальные усилия для получения профилактической вакцины против ВИЧ. Хотя и было разработано несколько вакцин-кандидатов, при клиническом исследовании они оказались неспособными предотвращать инфекцию ВИЧ-1.

- 5 **[0005]** Образование ответа в форме антител, способных к нейтрализации широкого диапазона клинических изолятов, остается основной проблемой при разработке вакцины против вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1). Существует острая и неотложная потребность в вакцине, которая являлась бы безопасной и эффективной во всем мире. Настоящее изобретение направлено на
- 10 удовлетворение данной и других неудовлетворенных потребностей в данной области техники.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

- [0006]** Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предложены
- 15 модифицированные белки gp140 оболочки ВИЧ-1. Белки состоят из полипептида gp120 и полипептида gp41, причем N-конец гептадного участка 1 (heptad region 1, HR1) полипептида gp41 заменен последовательностью петли, составляющей от приблизительно 6 до приблизительно 14 остатков аминокислот в длину, которая стабилизирует структуру gp140 в состоянии до слияния. В некоторых из данных
- 20 белков полипептид gp41 представляет собой gp41_{ECTO}. Предпочтительно, модифицированный белок gp140 ВИЧ-1 представляет собой тример. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид gp120 и полипептид gp41 получены из одного штамма или подтипа ВИЧ-1. Например, как полипептид gp120, так и полипептид gp41 в модифицированном белке gp140 ВИЧ-1 могут быть получены
- 25 из штамма BG505 ВИЧ-1. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид gp120 и полипептид gp41 получены из различных штаммов или подтипов ВИЧ-1. Например, сконструированный полипептид gp41 из штамма BG505 ВИЧ-1 в соответствии с примерами настоящего документа можно применять для образования химерных иммуногенов gp140 с полипептидом gp120, полученным из
- 30 многих других штаммов или подтипов ВИЧ-1.

[0007] В некоторых модифицированных белках gp140 оболочки ВИЧ-1 согласно настоящему изобретению последовательность петли содержит (GS)_n (SEQ ID NO:23), причем n представляет собой любое целое число от 3 до 7 включительно. Согласно некоторым из данных вариантов реализации

последовательность петли представляет собой (GS)₄ (SEQ ID NO:24). Согласно некоторым вариантам реализации последовательность петли получена посредством рациональной модификации (редизайна). Согласно некоторым из данных вариантов реализации последовательность петли получена посредством

5 белкового дизайна на основе ансамблей. В некоторых модифицированных белках gp140 ВИЧ-1 согласно настоящему изобретению последовательность петли содержит 10 остатков аминокислот. Некоторые примеры данных последовательностей петли представлены в SEQ ID NO:1-5. В некоторых других модифицированных белках gp140 ВИЧ-1 последовательность петли содержит 8

10 остатков аминокислот. Некоторые примеры данных последовательностей петли представлены в SEQ ID NO:6-10.

[0008] Согласно некоторым вариантам реализации модифицированные белки gp140 ВИЧ-1 согласно настоящему изобретению также содержат последовательность гибкого линкера, которая заменяет последовательность сайта

15 расщепления между gp120 и gp41. Согласно некоторым из данных вариантов реализации последовательность линкера содержит последовательность (G₄S)₂ (SEQ ID NO:22) или SGS, которая заменяет остатки 508 – 511 в сайте расщепления. Согласно некоторым другим вариантам реализации последовательность линкера содержит 8 остатков аминокислот и заменяет остатки 501 – 518 в сайте

20 расщепления. Согласно данным вариантам реализации нумерация остатков аминокислот соответствует таковой штамма BG505. SOSIP.664 gp140 ВИЧ-1. В некоторых иллюстративных белках последовательность линкера содержит последовательность, показанную согласно любой из SEQ ID NO:16-20.

[0009] Согласно некоторым вариантам реализации модифицированные белки gp140 ВИЧ-1 согласно настоящему изобретению также содержат (a) сконструированную дисульфидную связь между gp120 и gp41 и/или (b) стабилизирующую мутацию в gp41. Согласно некоторым из данных вариантов реализации сконструированная дисульфидная связь находится между остатками A501C и T605C, и стабилизирующая мутация представляет собой I559P.

[0010] Некоторые модифицированные белки gp140 ВИЧ-1 согласно настоящему изобретению содержат тример gp140, полученный из штамма BG505 ВИЧ-1, причем каждый мономер gp140 содержит полипептид gp120 и полипептид gp41_{ECTO}, и N-конец гептадного участка 1 (HR1) (SEQ ID NO:28) в полипептиде gp41_{ECTO} заменен последовательностью петли, представленной в SEQ ID NO:6.

Согласно некоторым из данных вариантов реализации белок дополнительно содержит (а) последовательность линкера $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO:22), которая заменяет остатки 508 – 511 в сайте расщепления, и (b) сконструированную дисульфидную связь между остатками A501C и T605C.

5 **[0011]** Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены иммуногены вакцины против ВИЧ-1, которые содержат модифицированный тримерный белок gp140 оболочки ВИЧ-1. В данных иммуногенах белок gp140 содержит полипептид gp120 и полипептид gp41_{ECTO}, причем N-конец гептадного участка 1 (HR1) полипептида gp41_{ECTO} заменен последовательностью петли
10 размером от приблизительно 6 до приблизительно 14 остатков аминокислот, которая стабилизирует структуру gp140 в состоянии до слияния. Согласно некоторым вариантам реализации последовательность петли содержит $(GS)_n$ (SEQ ID NO:23), причем n представляет собой любое целое число от 3 до 7 включительно. Согласно некоторым из данных вариантов реализации
15 последовательность петли содержит последовательность $(GS)_4$ (SEQ ID NO:24). Согласно некоторым вариантам реализации последовательность петли получена посредством рационального редизайна, например, посредством белкового дизайна на основе ансамблей. Согласно некоторым вариантам реализации последовательность петли содержит 10 остатков аминокислот, например, любую
20 последовательность, как представлено в SEQ ID NO:1-5. Согласно некоторым другим вариантам реализации последовательность петли содержит 8 остатков аминокислот, например, последовательность, как представлено в любой из SEQ ID NO:6-10.

[0012] Некоторые иммуногены вакцины против ВИЧ-1 согласно настоящему
25 изобретению дополнительно содержат последовательность гибкого линкера, которая заменяет последовательность сайта расщепления между gp120 и gp41_{ECTO}. Согласно некоторым из данных вариантов реализации последовательность линкера содержит $(G_4S)_2$ или SGS и заменяет остатки 508 – 511 в сайте расщепления. Согласно некоторым вариантам реализации последовательность
30 линкера содержит 8 остатков аминокислот и заменяет остатки 501 – 518 в сайте расщепления. Согласно данным вариантам реализации нумерация остатков аминокислот соответствует таковой штамма BG505. SOSIP.664 gp140 ВИЧ-1. Согласно некоторым вариантам реализации последовательность линкера содержит последовательность, как представлено в любой из SEQ ID NO:16-20.

[0013] Некоторые иммуногены вакцины против ВИЧ-1 согласно настоящему изобретению дополнительно содержат сконструированную дисульфидную связь между gp120 и gp41. Согласно некоторым из данных вариантов реализации сконструированная дисульфидная связь находится между остатками A501C и T605C. Некоторые из иммуногенов вакцины против ВИЧ-1 содержат тример gp140, полученный из штамма BG505 ВИЧ-1, причем каждый мономер gp140 содержит полипептид gp120 и полипептид gp41^{ECTO}, причем N-конец гептадного участка 1 (HR1) (SEQ ID NO:28) в полипептиде gp41^{ECTO} заменен последовательностью петли, представленной в SEQ ID NO:6. Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный белок gp140 ВИЧ-1 также содержит (а) последовательность линкера (G₄S)₂ (SEQ ID NO:22), которая заменяет остатки 508 – 511 в сайте расщепления, и (b) сконструированную дисульфидную связь между остатками A501C и T605C.

[0014] Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложены композиции вакцины против ВИЧ-1, которые содержат полученный из Env ВИЧ-1 тримерный иммуноген, презентированный на самособираемой наночастице или вирусоподобной частице (ВПЧ). Согласно некоторым из данных вариантов реализации полученный из Env ВИЧ-1 тримерный иммуноген представляет собой V1V2, gp120 или gp140. Согласно некоторым вариантам реализации полученный из Env ВИЧ-1 тримерный иммуноген представляет собой модифицированный белок gp140, который содержит полипептид gp120 и полипептид gp41^{ECTO}, причем N-конец гептадного участка 1 (HR1) полипептида gp41^{ECTO} заменен последовательностью петли размером от приблизительно 6 до приблизительно 14 остатков аминокислот, которая стабилизирует структуру gp140 в состоянии до слияния.

[0015] Согласно некоторым вариантам реализации последовательность петли содержит (а) последовательность (GS)_n (SEQ ID NO:23), причем n представляет собой любое целое число от 3 до 7 включительно, или (b) последовательность, сконструированную посредством рационального редизайна, – белкового дизайна на основе ансамблей. Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный белок gp140 ковалентным способом слит с платформой наночастиц. Согласно различным вариантам реализации платформа наночастиц содержит тримерную последовательность. Согласно некоторым из данных вариантов реализации платформа наночастиц представляет собой дигидролипоил

ацилтрансферазу (E2P), ферритин или люмазинсинтазу (LS). Согласно некоторым вариантам реализации платформа наночастиц содержит на поверхности одну или несколько осей симметрии третьего порядка, причем N-конец каждой мономерной субъединицы находится в непосредственной близости от оси симметрии третьего порядка, и расстояние между тремя N-концами соответствует расстоянию между С-концами тримера модифицированного белка gp140. Согласно некоторым вариантам реализации С-конец последовательности модифицированного белка gp140 слит с N-концом субъединицы последовательности платформы наночастиц. Согласно некоторым вариантам реализации платформа наночастиц содержит самособираемую наночастицу диаметром приблизительно 20 нм или менее, которая собрана из 12 или 24 субъединиц. Некоторые композиции вакцины против ВИЧ-1 согласно настоящему изобретению могут также содержать адъювант.

[0016] В некоторых композициях вакцины против ВИЧ-1 согласно настоящему изобретению тример gp140 получен из штамма BG505 ВИЧ-1 с последовательностью петли, представленной в SEQ ID NO:6. Некоторые из композиций также содержат (а) последовательность линкера $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO:22), которая заменяет остатки 508 – 511 в сайте расщепления, и (b) сконструированную дисульфидную связь между остатками A501C и T605C.

[0017] Согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении предложены способы предотвращения инфекции ВИЧ-1 у субъекта. Данные способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуногена ВИЧ-1 или композиции вакцины, описанной в настоящем документе. Введение иммуногена приводит к предотвращению инфекции ВИЧ-1 у субъекта. Согласно связанному аспекту в настоящем изобретении предложены способы лечения инфекции ВИЧ-1 или вызова иммунного ответа против ВИЧ-1 у субъекта. Данные способы включают введение субъекту фармацевтической композиции, которая содержит терапевтически эффективное количество иммуногена ВИЧ-1 или вакцины, описанной в настоящем документе.

[0018] Последующее понимание природы и преимуществ настоящего изобретения может быть достигнуто посредством ссылки на оставшиеся части описания и формулу изобретения.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0019] Фигура 1 иллюстрирует компьютерный редизайн N-конца HR1 и сайта расщепления. (а) Атомарная модель и молекулярная поверхность тримера BG505 SOSIP.664 (идентификационный номер базы данных белковых структур PDB: 4TVP) с gp120 и двумя участками gp41_{ECTO} (остатки 518 – 547 и 569 – 664) в пределах одного промотора gp140, окрашенные синим, оранжевым и красным цветом, соответственно. Увеличенное изображение структуры gp140, окружающей N-конец HR1 (остатки 548 – 568), и участок, содержащий сайт расщепления (остатки 505 – 518), представлено справа со структурными пропусками, соединенными черными пунктирными линиями. (б) Схематическое представление редизайна HR1. (с) Компьютерная процедура для белкового дизайна на основе ансамблей *de novo* участка HR1 (остатки 548 – 568). После локального отбора остовов в торсионном пространстве (этап 1) и исчерпывающего поиска в пространстве последовательность-структура (этап 2) сконструированные последовательности №№1-5 (SEQ ID NO:11-15, соответственно) ранжировали в зависимости от энергии (этап 3) перед ручным выбором кандидатов для экспериментального подтверждения.

[0020] На фигуре 2 представлены дизайн и подтверждение генерических последовательностей петли HR1 (линкера), (GS)₄ (SEQ ID NO:24) для стабилизации тримера Env. (а) Схематическое представление дизайна генерического линкера HR1 (HR1-G). (б) Профили ЭХ (эксклюзионной хроматографии) тримеров SOSIP и HR1-G на колонке Superdex 200 10/300 для BG505 кланды А (сверху, слева), JRFL кланды В (сверху, справа), DU172.17 кланды С (посередине, два варианта редизайна HR1, полученные посредством белкового дизайна на основе ансамблей *de novo*, включены справа) и рекомбинантного штамма CH115.12 В'/С (снизу, CSF-SOS включен справа). Отмечены значение УФ-поглощения пика тримера и соотношения значений УФ-поглощения пика агрегатов (при объеме 9 мл) и пика димера/мономера (при объеме 12 мл) относительно пика тримера (при объеме 10,5 мл).

[0021] На фигуре 3 представлен белковый дизайн на основе ансамблей участка HR1 с длинами петли 8 и 10 остатков. (а) Конформационные ансамбли петель HR1 длиной 8 (слева) и 10 остатков (справа), окрашенные в зеленый цвет, с gp120 и двумя участками gp41_{ECTO} (518 – 547 и 569 – 664) в пределах одного промотора gp140, окрашенными синим, оранжевым и красным цветом, соответственно. (б)

Среднеквадратическая (СК) флуктуация $C\alpha$ сконструированных посредством редизайна петель HR1 длиной 8 (верхний чертеж) и 10 остатков (нижний чертеж).

(с) Корреляция между показателем RAPDF и среднеквадратической (СК) флуктуацией $C\alpha$, определенная для сконструированных посредством редизайна

петель HR1 длиной 8 (слева) и 10 остатков (справа). (d) 5 последовательностей с наивысшими показателями, выбранных вручную из вариантов редизайна HR1 длиной 8 остатков (слева; SEQ ID NO:6-10, соответственно) и редизайна HR1 длиной 10 остатков (справа; SEQ ID NO:1-5, соответственно), между остатками G547 и T569. Последовательность HR1, охватывающая его N-конец (SEQ ID NO:27), включая остатки 548 – 568 (SEQ ID NO:28), замененные последовательностями петли, представлена выше данных последовательностей петли с наивысшими показателями. Участок в SOSIP.664 ДТ (дикого типа), который подвергали компьютерному дизайну.

[0022] На фигуре 4 представлены белковый дизайн на основе ансамблей

участка, содержащего сайт расщепления (500 – 519), и биохимическая характеристика 5 вариантов дизайна с наивысшими показателями. (а)

Конформационный ансамбль петель длиной 8 остатков, соединяющих R500 и F519 (слева), распределение СКФ (среднеквадратической флуктуации) $C\alpha$ петель длиной 8 остатков (сверху справа) и корреляция между показателем RAPDF и СКФ

$C\alpha$ (снизу справа). (b) 5 вариантов дизайна конструкций CST (cleavage site truncated, с усеченным сайтом расщепления) длиной 8 остатков с наивысшими показателями (SEQ ID NO:16-20, соответственно) представлены ниже последовательности, содержащей сайт расщепления (SEQ ID NO:21). Участок в SOSIP.664 ДТ, который подвергали компьютерному дизайну, отмечен желтым

цветом. (с) анализ методом ГН-ПААГ (голубого нативного электрофореза в полиакриламидном геле) пяти экспрессированных в 293 F очищенных на GNL (колонке с лектином *Galanthus nivalis*) конструкций BG505 с усеченным сайтом расщепления (CST), CST1-5, после анализа методом ЭХ на колонке Superdex 200 10/300. Для конструкции каждого тримера отмечен диапазон фракций ЭХ. Для CST

1 на геле ГН отмечены тример, димер, мономер и неизвестная форма Env.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Обзор

[0023] Целью разработки вакцины против вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) является индукция защитных или терапевтических ответов нейтрализующих антител широкого спектра действия (шНАТ; broadly neutralizing antibody, bNAbs) посредством вакцинирования. Все шНАТ, идентифицированные на сегодняшний день, нацелены на тример гликопротеина оболочки (envelope glycoprotein, Env) на поверхности вирионов ВИЧ-1. Белок-предшественник Env, gp160, поступает из эндоплазматической сети (ЭС) в аппарат Гольджи и расщепляется клеточными протеазами семейства фуринов с образованием зрелой формы. Расщепленный тример Env ангажирует рецепторы хозяина опосредовать поступление вируса и представляет собой первичную цель гуморальных иммунных ответов. Функциональный Env представляет собой тример гетеродимеров, каждый из которых содержит рецептор-связывающий белок, gp120, и трансмембранный белок, gp41, которые удерживаются вместе посредством нековалентных взаимодействий. Данная зрелая форма Env является метастабильной, поскольку она готова к прохождению кардинальных и необратимых конформационных изменений после связывания с рецептором и корецептором хозяина для опосредования слияния мембран. Метастабильность Env также облегчает ускользание от иммунологического надзора, вызывая утрату gp120 и образование разнообразного набора нативных, более открытых и ненативных конформаций.

[0024] В попытке преодолеть метастабильность Env и создать стабильные гомогенные тримеры gp140 для структурных исследований и исследований вакцин были предложены различные стратегии. Например, разработка тримера BG505 SOSIP.664 gp140 (Sanders et al., PLoS Pathog. 9(9):e1003618, 2013) облегчила проведение структурных анализов с высоким разрешением и обеспечила рациональное обоснование дизайна вакцины на основе тримера, который позволяет распространять дизайн SOSIP на другие штаммы ВИЧ-1, включать новые стабилизирующие мутации и удалять фуриновую зависимость посредством модификации сайта расщепления. Однако первоочередной задачей является очистка тримера с целью минимизации количества нежелательных форм Env и неправильно свернутых тримеров. Для очистки тримера были разработаны сложные способы, такие как аффинная очистка шНАТ, негативная селекция и многоцикловая ЭХ, которые, безусловно, можно адаптировать для производства промышленного масштаба, однако для этого, вероятно, потребуются особые

соображения. Вполне вероятно, что примеси в тримере и общая неэффективность продукции белка связаны с фундаментальными причинами метастабильности, которые не были полностью решены в предшествующих вариантах дизайна тримера ВИЧ-1.

5 **[0025]** Настоящее изобретение отчасти основывается на разработке авторами настоящего изобретения сконструированных посредством компьютерного редизайна молекул тримера Env ВИЧ-1 в качестве иммуногенов вакцины. Как подробно описано в разделе примеров ниже, авторы настоящего изобретения исследовали первичные причины метастабильности тримера ВИЧ-1 и изучали

10 альтернативные варианты дизайна тримера. Авторы настоящего изобретения высказали предположение, что неупорядоченность, наблюдаемая на N-конце HR1 (остатки 548 – 568), свидетельствует о метастабильности, которую потенциально можно минимизировать с помощью белковой инженерии. Авторы настоящего изобретения сконструировали посредством редизайна в значительной степени

15 неупорядоченный изгиб в гептадном участке 1 (HR1), который соединяет длинную центральную спираль HR1 с участком пептида слияния, и по существу улучшили выход надлежащим способом свернутых тримеров. Дополнительно, в рамках редизайна HR1 сайт расщепления между gp120 и gp41 был заменен различными линкерами. Более конкретно, авторы настоящего изобретения исследовали 10

20 тримеров BG505 с N-концевым участком HR1, сконструированным посредством компьютерного редизайна. Данные конструкции продемонстрировали по существу более высокий выход и чистоту тримера с SOSIP-подобными свойствами, которые были подтверждены кристаллическими структурами, исследованием методом ЭМ (электронной микроскопии) и связыванием с антителом. Затем авторы настоящего изобретения провели исследование влияния на структурные и антигенные

25 свойства замены сайта расщепления фурина между gp120 и gp41 на линкер в рамках редизайна выбранного HR1. Данные исследования позволили обнаружить чувствительность фолдинга gp140 к модификациям данного протеолитического сайта, с промежуточным состоянием слияния, наблюдаемым для тримеров с

30 короткими линкерами, в которых отсутствовала мутация SOS. Напротив, тримеры со сконструированным посредством редизайна HR1 с длинным линкером, называемые нерасщепленные тримеры, оптимизированные в состоянии до слияния (uncleaved pre-fusion-optimized, UFO), принимали подобную нативной конформацию, которая характеризовалась многими существенными свойствами

тримера SOSIP. Дополнительно, авторы настоящего изобретения продемонстрировали применимость генерического линкера HR1 при стабилизации тримера для различных штаммов ВИЧ-1. Следующие исследования, проведенные авторами настоящего изобретения, продемонстрировали, что сконструированные домены gp41, описанные в настоящем документе, можно применять для спаривания с полипептидом gp120 из многих различных штаммов или подтипов ВИЧ-1 с образованием «химерных» тримеров gp140, например, «UFO-BG» или «UFO-U» в соответствии с примерами настоящего документа. Взятые вместе, данные исследования продемонстрировали общий подход для стабилизации тримеров Env из различных штаммов ВИЧ-1.

[0026] Помимо полученных из gp140 растворимых тримерных иммуногенов с модифицированным участком HR1, авторы настоящего изобретения дополнительно исследовали экспонирование тримерных антигенов ВИЧ-1 на наночастицах с углубленной структурной и антигенной характеристикой. Авторы настоящего изобретения высказали предположение, что тримерные антигены Env, такие как V1V2 и gp120, могут быть презентированы на поверхности наночастиц в подобных нативной конформациях вокруг осей симметрии третьего порядка. Для изучения данного предположения авторы настоящего изобретения разработали конструкции, содержащие V1V2 и gp120, слитые с N-концом субъединицы ферритина. Данные химерные антигены собирались в наночастицы с высокой аффинностью в отношении шНАТ, нацеленных на вершину, а также другие ключевые эпитопы, соответствующие конформациям тримера, подобным нативной. Затем авторы настоящего изобретения провели исследование экспонирования стабилизированного тримера gp140 с изгибом сконструированного посредством редизайна гептадного повтора 1 (HR1) на частицах, в котором было продемонстрировано существенное улучшение чистоты тримера. Чтобы облегчить данный анализ, авторы настоящего изобретения разработали три конструкции gp140-ферритин, содержащие различные линкеры, с gp41, усеченным в положении 664 или 681. В то время как все наночастицы gp140-ферритин связывались с направленными на вершину шНАТ с субпикомолярными аффинностями, наночастица gp140, содержащая MPER (membrane-proximal external region, проксимальную внешнюю область мембраны), также могла распознаваться MPER-специфичным шНАТ 4E10. Помимо ферритина, авторы настоящего изобретения также исследовали применимость крупной 60-мерной

наночастицы E2p для презентации тримеров gp120 и gp140. Как было продемонстрировано в настоящем документе, наночастица gp140-E2p, несущая 20 надлежащим способом свернутых тримеров, продемонстрировала эффективную сборку частиц и желаемую антигенность.

5 **[0027]** В соответствии с данными иллюстративными исследованиями в настоящем изобретении предложены различные иммуногены вакцины против ВИЧ-1 и варианты их клинического применения. Некоторые иммуногены вакцины против ВИЧ-1 согласно настоящему изобретению являются растворимым полученным из gp140 белком, который содержит модифицированный N-конец участка HR1 в gp41, как раскрыто в настоящем документе. Некоторые иммуногены ВИЧ-1 согласно настоящему изобретению содержат полученный из Env ВИЧ-1 тримерный белок, презентируемый на платформе наночастиц. В настоящем изобретении также предложены варианты терапевтического и профилактического применения композиций вакцины против ВИЧ-1 согласно настоящему изобретению.

15 **[0028]** Если в настоящем документе 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 настоящем документе, 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. (ingbrou 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). В следующих разделах представлены дополнительные руководства по реализации на практике композиций и способов согласно настоящему изобретению.

5

II. Определения

[0029] Если не указано обратное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое общепринято понимается средними специалистами в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Специалист может найти общие определения множества терминов, применяемых в настоящем изобретении, в следующих источниках: *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); и *A Dictionary of Biology (Oxford Paperback Reference)*, Martin and Hine (Eds.), Oxford University Press (4th ed., 2000). Дополнительные уточнения некоторых из данных терминов, как они применяются конкретно в настоящем изобретении, представлены в настоящем документе.

[0030] В настоящем документе формы единственного числа означают как единственное, так и множественное число, если контекст однозначно не диктует обратное. Например, «полученный из Env тример» может означать одну или несколько молекул полученного из Env тримера и может считаться эквивалентным фразе «по меньшей мере один полученный из Env тример».

[0031] В настоящем документе термины «антиген» или «иммуноген» используются взаимозаменяемо для обозначения вещества, как правило, белка, способного к индукции иммунного ответа у субъекта. Данный термин также означает белки, которые являются иммунологически активными в том смысле, что после введения субъекту (напрямую или посредством введения субъекту нуклеотидной последовательности или вектора, которые кодируют белок) они

способны вызывать иммунный ответ гуморального и/или клеточного типа, направленный против данного белка.

[0032] Консервативные замены аминокислот, которые обеспечивают функционально подобные аминокислоты, хорошо известны в данной области

5 техники. Каждая из следующих шести групп включает аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга: 1) Аланин (A), Серин (S), Треонин (T); 2) Аспарагиновая кислота (D), Глутаминовая кислота (E); 3) Аспарагин (N), Глутамин (Q); 4) Аргинин (R), Лизин (K); 5) Изолейцин (I), Лейцин (L), Метионин (M), Валин (V); и 6) Фенилаланин (F), Тирозин (Y), Триптофан (W).

10 Не все положения оснований в пределах белка допускают «консервативную» в противном случае замену. Например, если остаток аминокислоты является важным для функции белка, даже консервативная в противном случае замена может нарушить данную активность, например, специфичное связывание антитела с эпитопом-мишенью может быть нарушено консервативной мутацией в эпитопе-мишени.

15

[0033] Эпитоп означает антигенную детерминанту. Эпитоп представляет собой конкретные химические группы или пептидные последовательности на молекуле, которые являются антигенными, то есть, вызывают специфический иммунный ответ, например, эпитоп представляет собой область антигена, на

20 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.

[0034] Эффективное количество вакцины или другого средства является достаточным для образования желаемого ответа, такого как снижение или

25 устранение признака либо симптома состояния или заболевания, такого как СПИД. Например, эффективное количество может представлять собой количество, необходимое для ингибирования репликации вируса или для измеряемого изменения внешних симптомов вирусной инфекции, таких как повышение числа Т-клеток в случае инфекции ВИЧ-1. В целом, данное количество будет

30 достаточным для измеряемого ингибирования репликации или инфекционности вируса (например, ВИЧ). При введении субъекту, как правило, будет применяться доза, которая позволит достичь в ткани-мишени (например, в лимфоцитах) концентраций, которые, как было показано, обеспечивают ингибирование репликации вируса *in vitro*. В некоторых примерах «эффективное количество»

представляет собой таковое, которое лечит (включая профилактику) один или несколько симптомов и/или первопричин любого нарушения или заболевания, например, для лечения ВИЧ. В одном примере эффективное количество представляет собой терапевтически эффективное количество. В одном примере эффективное количество представляет собой количество, которое предотвращает развитие одного или нескольких признаков или симптомов конкретного заболевания или состояния, такого как один или несколько признаков или симптомов, связанных со СПИДом.

[0035] Ферритин представляет собой глобулярный белок, обнаруженный у всех животных, бактерий и растений. Он выступает, преимущественно, для контроля скорости и локализации образования полинуклеарного $\text{Fe(III)}_2\text{O}_3$ посредством транспортирования гидратированных ионов железа и протонов в минерализованную сердцевину и из нее. Глобулярная форма ферритина образована из мономерных субъединичных белков (также обозначаемых «мономерные субъединицы ферритина»), которые представляют собой полипептиды молекулярной массой приблизительно 17 – 20 кДа.

[0036] В настоящем документе 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 или их можно объединить с применением последовательности линкера. В настоящем документе 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, последовательности аминокислот мономерных субъединиц, которые образуют ферритин, и последовательности аминокислот гликобелков gp120 или gp41 ВИЧ-1 в норме не обнаруживаются соединенными посредством пептидной связи.

[0037] Белок оболочки (Env) ВИЧ-1 изначально синтезируется в виде более длинного белка-предшественника размером 845 – 870 аминокислот, обозначенного gp160. gp160 образует гомотример и подвергается гликозилированию в аппарате Гольджи. Гликопротеин gp160 *in vivo* подвергается эндопротеолитическому процессингу с образованием зрелых гликобелков оболочки gp120 и gp41, которые

нековалентно связаны друг с другом в комплексе на поверхности вируса. Белок поверхности gp120 содержит высокоаффинный сайт связывания с CD4 человека, первичным рецептором ВИЧ, а также домены, которые взаимодействуют со слитыми корецепторами, такими как хемокиновые рецепторы CCR5 и CXCR4.

5 Белок gp41 расположен в вирусной мембране и содержит на своем amino-конце последовательность аминокислот, важную для слияния вирусной и клеточной мембран. Нативная, компетентная к слиянию форма комплекса гликопротеина оболочки ВИЧ-1 представляет собой тримерную структуру, состоящую из трех субъединиц gp120 и трех субъединиц gp41. Рецептор-связывающие (CD4 и
10 корецептор) сайты расположены во фрагментах gp120, тогда как пептиды слияния расположены в компонентах gp41. Иллюстративная последовательность полипептидов gp160 дикого типа представлена в базе данных GenBank, например, под учетными номерами AAB05604 и AAD12142.

[0038] gp140 означает олигомерную форму белка оболочки ВИЧ, которая
15 содержит все gp120 и полный эктодомен gp41.

[0039] gp120 представляет собой белок оболочки вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). gp120 содержит большинство внешних, экспонированных на поверхности доменов комплекса гликопротеина оболочки ВИЧ, и именно gp120 связывается как с клеточными рецепторами CD4, так и с клеточными
20 хемокиновыми рецепторами (такими как CCR5). Зрелые полипептиды gp120 дикого типа содержат в первичной последовательности приблизительно 500 аминокислот. Gp120 является обильно N-гликозилированным, в результате чего его кажущаяся молекулярная масса составляет 120 кДа. Полипептид состоит из пяти консервативных областей (C1-05) и пяти областей высокой вариабельности
25 (V1-V5). Третичная структура гликопротеина gp120 представлена тремя основными структурными доменами (внешний домен, внутренний домен и мостиковый слой) и вариабельными петлями. См., например, публикации Wyatt et al., Nature 393, 705-711, 1998; и Kwong et al., Nature 393, 649-59, 1998. Внутренний домен, как считают, взаимодействует с гликопротеином оболочки gp41, тогда как
30 внешний домен экспонирован на собранном тримере гликопротеина оболочки.

[0040] Вариабельная область 1 и вариабельная область 2 (домен V1/V2) gp120 состоят из приблизительно 50 – 90 остатков, которые содержат две из наиболее вариабельных частей ВИЧ-1 (петля V1 и петля V2), причем один из десяти остатков домена V1/V2 является N-гликозилированным.

[0041] gp41 представляет собой продукт протеолиза предшественника белка оболочки ВИЧ. Он содержит N-концевой пептид слияния (fusion peptide, FP), трансмембранный домен, а также эктодомен, который соединяет пептид слияния и трансмембранный домен. gp41 остается в тримерной конфигурации и взаимодействует с gp120 нековалентным способом. Последовательность аминокислот иллюстративного gp41 представлена в базе данных GenBank под учетным № CAD20975.

[0042] BG505 SOSIP.664 gp140 представляет собой иммуноген Env ВИЧ-1, разработанный на основе тримера gp140 из штамма BG505 кланды А. Он содержит ковалентную связь между расщепленными gp120 и gp41, а также сконструированной дисульфидной связью (называемой SOS). Помимо этого, данный иммуноген содержит мутацию I559P (называемую IP) для дестабилизации конформации gp41 после слияния, а также усечение проксимальной внешней области мембраны (membrane-proximal external region, MPER) в остатке 664 для улучшения растворимости. Данный иммуноген ВИЧ-1 характеризуется исключительным антигенным профилем и превосходной структурной мимикрией нативному шипу. С применением тримера SOSIP в качестве зонда для сортировки были идентифицированы и охарактеризованы новые шНАТ. Дизайн SOSIP также был распространен на другие штаммы ВИЧ-1 и позволил встроить дополнительные стабилизирующие мутации. Недавно сообщалось об иммуногенности тримеров SOSIP на кроликах и нечеловекообразных приматах, что подготовило почву для проведения исследований вакцины на человеке.

[0043] Система нумерации HXB2 представляет собой эталонную систему нумерации для последовательностей белка и нуклеиновой кислоты ВИЧ с применением последовательностей штамма HXB2 ВИЧ-1 в качестве эталона для всех других последовательностей штамма ВИЧ. Среднему специалисту в данной области техники известна система нумерации HXB2, и данная система представлена в руководствах "Numbering Positions in HIV Relative to HXB2CG," Bette Korber et al., Human Retroviruses and AIDS 1998: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. Korber B, Kuiken C L, Foley B, Hahn B, McCutchan F, Mellors J W, and Sodroski J, Eds. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N. Mex.

[0044] Иммуноген представляет собой белок или его 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.

[0045] Иммуногенная поверхность представляет собой поверхность молекулы, например, белка, такого как gp120, способную вызывать иммунный ответ. Иммуногенная поверхность включает определяющие свойства данной поверхности, например, трехмерную форму и заряд поверхности. В некоторых примерах иммуногенная поверхность определена аминокислотами на поверхности белка или пептида, которые осуществляют контакт с антителом, таким как нейтрализующее антитело, когда белок и антитела связаны. Эпитоп-мишень включает иммуногенную поверхность. Иммуногенная поверхность является синонимичной антигенной поверхности.

[0046] Иммунный ответ означает ответ клетки иммунной системы, такой 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 реализации ответ представляет собой В-клеточный ответ и приводит к наработке специфичных антител.

[0047] Иммуногенная композиция означает композицию, содержащую иммуногенный полипептид, который индуцирует измеряемый ответ ЦТЛ (цитотоксических лимфоцитов) против вируса, экспрессирующего иммуногенный полипептид, или индуцирует измеряемый В-клеточный ответ (такой как наработка антител) против иммуногенного полипептида.

[0048] Идентичность или подобие последовательности между двумя или более последовательностями нуклеиновой кислоты либо двумя или более последовательностями аминокислот выражают с помощью показателей идентичности или подобия между последовательностями. Идентичность последовательности можно измерять с помощью показателей процента идентичности; чем выше процент, тем более идентичными являются последовательности. Гомологи или ортологи последовательностей нуклеиновой кислоты или аминокислот характеризуются относительно высокой степенью идентичности/подобия последовательности при выравнивании с применением

стандартных способов. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Различные программы и алгоритмы выравнивания описаны в публикациях: 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. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990, в которых представлено подробное обсуждение способов выравнивания последовательностей и расчетов гомологии.

[0049] Симметрия относительно оси вращения, также известная в биологическом контексте как радиальная симметрия, означает способность объекта выглядеть одинаково после определенного количества вращения. У объекта может быть более чем одна симметрия относительно оси вращения; например, если его отражения или переворачивание не посчитаны. Степень симметрии относительно оси вращения – это то, на сколько градусов нужно повернуть форму, чтобы она выглядела одинаково на отличной стороне или вершине. Это не может быть та же самая сторона или вершина. Симметрия относительно оси вращения порядка n , также называемая n -кратной симметрией относительно оси вращения или дискретной симметрией относительно оси вращения n -ого порядка относительно конкретной точки (в двумерном пространстве) или оси (в трехмерном пространстве; например, оси симметрии третьего порядка, описанной в настоящем документе), означает, что вращение на угол $360^\circ/n$ (180° , 120° , 90° , 72° , 60° , $51\frac{3}{7}^\circ$ и т.д.) не изменяет объект.

[0050] Бактериофаг Q_β (в настоящем документе обозначен Q_β или Q) представляет собой икосаэдрический вирус диаметром 25 нм. Его хозяином является *Escherichia coli*. Q_β поступает в клетку-хозяин со стороны F-пилей. геном Q_β составляет 4217 нуклеотидов в длину. Геном содержит три открытые рамки считывания и кодирует четыре белка: A1, A2, CP и $q\beta$ репликазу. См., например, публикацию van Duin et al., "Single-stranded RNA phages. Chapter 15". In Calendar, R. L. The Bacteriophages (Second ed., 2006). Oxford University Press. pp. 175–196. Геном Q_β является в высшей степени структурированным, что регулирует экспрессию генов и защищает геном от РНКаз хозяина.

[0051] Термин «субъект» означает любое животное, которое классифицируют как млекопитающее, например, человека и млекопитающих, отличных от человека. 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 настоящем документе взаимозаменяемо. Предпочтительно, субъект представляет собой человека.

[0052] Термин «лечение» или «облегчение» включает введение субъекту соединений или средств для предотвращения или отсрочивания манифестации симптомов, осложнений или биохимических показателей заболевания (например, ВИЧ-инфекции), облегчение симптомов или остановку или ингибирование последующего развития заболевания, состояния или нарушения. Субъекты, которые нуждаются в лечении, включают таковых, уже страдающих от заболевания или нарушения, а также таковых, подверженных риску развития нарушения. Лечение может являться профилактическим (для предотвращения или отсрочивания манифестации заболевания или для 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 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 полинуклеотид (такой как нуклеиновая кислота, кодирующая описанный антиген), пептид или полипептид (такой как описанный антиген), вирус, клетку или один или несколько компонентов клетки.

[0054] Вирусоподобная частица (ВПЧ) означает нереплицирующуюся вирусную оболочку, полученную из любого из нескольких вирусов. ВПЧ 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. ВПЧ могут образовываться спонтанно после рекомбинантной экспрессии белка в соответствующей системе экспрессии. Способы получения

конкретных ВПЧ известны в данной области техники. Присутствие ВПЧ 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, ВПЧ можно выделить посредством центрифугирования в градиенте плотности и/или идентифицировать посредством характерных полос плотности. В качестве альтернативы, можно провести анализ методом криоэлектронной микроскопии на витрифицированных водных образцах препарата ВПЧ, о котором идет речь, и записать изображения при соответствующих условиях экспозиции.

III. Модифицированные белки gp140 ВИЧ-1 и иммуногены со сконструированным посредством редизайна участком HR1

15 **[0055]** Env ВИЧ-1 представляет собой гетеродимер трансмембранного гликопротеина (gp41) и гликопротеина поверхности (gp120). Данные димеры организованы на поверхности вирусной мембраны в виде тримеров. Тримерные иммуногены ВИЧ-1 согласно настоящему изобретению образованы из родственного gp140 белка, который содержит полученный из gp120 полипептид и

20 полученный из gp41 полипептид со сконструированным посредством редизайна N-концом (остатки 548 – 568) гептадного участка 1 (HR1) из gp41. Родственный gp140 белок должен сохранять соответствующую тримерную структуру, описанную в настоящем документе (например, тримерную конформацию, подобную нативной). Полученный из gp120 полипептид и полученный из gp41 полипептид могут быть

25 нековалентно связаны, как в природном белке gp140 ВИЧ-1, или ковалентно связаны посредством последовательности линкера, описанной в настоящем документе. Хорошо охарактеризованный гликопротеин gp120 содержит сердцевину и несколько вариабельных петель или доменов (например, домен V1V2 и домен V3). При реализации настоящего изобретения на практике можно

30 применять различные полученные из gp120 полипептиды. Полученный из gp120 полипептид не должен содержать полноразмерную последовательность гликопротеина gp120 дикого типа. Таким образом, полученный из gp120 полипептид может представлять собой, например, природный белок gp120, домены V1V2 гликопротеина gp120, сердцевину gp120 (т.е. внутренний домен и

внешний домен) и только внешний домен сердцевины gp120. Согласно некоторым вариантам реализации применяемый полученный из gp120 полипептид содержит его участок, участвующий во взаимодействии с gp41, и антигенные эпитопы (например, внешний домен).

5 **[0056]** Как правило, полученный из gp140 полипептид должен нести и экспонировать нативные эпитопы (например, «сайты уязвимости ВИЧ-1» или «эпитопы нейтрализации широкого спектра действия»), распознаваемые одним или несколькими хорошо известными шНАТ против ВИЧ (например, PG9, PG16, CH03, PGDM1400, VRC01, 4E10 и 10E8). Например, PG9 представляет собой
10 нейтрализующее моноклональное антитело широкого спектра действия, которое специфично связывается с доменом V1/V2 gp120 ВИЧ-1 и предотвращает инфекцию клеток-мишеней ВИЧ-1 (см., например, публикации Walker et al., Nature, 477:466-470, 2011; и WO/2010/107939). Помимо этого, в настоящем изобретении также можно применять последовательности с консервативными
15 заменами аминокислот или последовательности, по существу идентичные полученному из gp140 полипептиду, примеры которых приведены в настоящем документе. Согласно различным вариантам реализации иммуногены вакцины согласно настоящему изобретению также характеризуются антигенностью специфического связывания с одним или несколькими (например, 2, 3, 4, 5 или
20 более) хорошо известными шНАТ против ВИЧ-1 (например, PG9, PG16, CH03, PGDM1400, VRC01, 4E10 и 10E8). Такую антигенность можно с легкостью оценить посредством способов, общепринято применяемых на практике в данной области техники, например, посредством анализа на системе Octet (Octet, ForteBio, Inc.). См., например, публикации Fera et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 111: 10275–
25 10280, 2014; и McGuire et al., J. Virol. 88: 2645-2657, 2014.

[0057] Помимо полученного из gp120 полипептида, родственный gp140 белок для получения тримерных иммуногенов ВИЧ-1 согласно настоящему изобретению также содержит полученный из gp41 полипептид со сконструированным посредством редизайна N-концом (остатки 548 – 568) гептадного участка 1 (HR1).
30 Согласно некоторым вариантам реализации полипептиды gp120 и gp41 в сконструированных иммуногенах gp140 согласно настоящему изобретению получены из одного штамма или подтипа ВИЧ-1. Согласно некоторым вариантам реализации полипептиды gp120 и gp120 в белке gp140 получены из различных штаммов или подтипов ВИЧ-1. Например, в соответствии с примерами настоящего

документа, модифицированный gp41 из штамма BG505 или универсальный домен gp41, полученный из базы данных последовательностей ВИЧ-1, можно объединить с gp120 из различных других штаммов или подтипов ВИЧ с образованием различных химерных тримерных иммуногенов gp140. Модифицированный

5 полученный из gp41 полипептид в сконструированных иммуногенах gp140 согласно настоящему изобретению, как правило, несет участок HR1 нативного белка gp41, за исключением модификации N-конца, описанной в настоящем документе. Участок HR1 претерпевает радикальное конформационное изменение в течение слияния вируса с клетками-хозяевами. Предпочтительно, полученный из

10 gp41 полипептид представляет собой растворимый полипептид, который содержит усеченную трансмембранную область, например, полипептид, содержащий эктодомен (gp41_{ECTO}), или полипептид, содержащий пептид слияния и эктодомен. Согласно различным вариантам реализации N-конец HR1 длиной 21 остаток (остатки 548 – 568) полученного из gp41 полипептида заменен более короткой

15 последовательностью петли для стабилизации структуры gp140 в состоянии до слияния. Последовательность петли может содержать от приблизительно 6 до приблизительно 14 остатков аминокислот. Конкретные последовательности петли, подходящие для тримерных иммуногенов ВИЧ-1 согласно настоящему изобретению, можно получить посредством рационального дизайна для

20 обеспечения надлежащей функции (например, стабилизации конформации gp140 в состоянии до слияния). Например, более короткие последовательности петли, заменяющие N-конец HR1, можно сконструировать посредством способа белкового дизайна на основе ансамблей *de novo*, примеры которого приведены в настоящем документе. Как подробно описано в разделе примеров в настоящем

25 документе, почти все варианты редизайна HR1 на основе компьютерного способа продемонстрировали существенное улучшение применительно к выходу и чистоте тримера.

[0058] Согласно некоторым вариантам реализации встроенная последовательность петли, заменяющая N-конец HR1, содержит 10 остатков

30 аминокислот. Конкретные примеры таких последовательностей петли представлены в SEQ ID NO:1-5. Согласно некоторым другим вариантам реализации заменяющая последовательность петли содержит 8 остатков аминокислот. Примеры таких последовательностей петли представлены в SEQ ID NO:6-15. Согласно еще одним вариантам реализации последовательность петли,

заменяющая N-конец HR1, может содержать приблизительно 6, 7, 9, 11, 12, 13 или 14 остатков аминокислот. Такие последовательности петли можно с легкостью получить с применением тех же способов рационального дизайна, примеры которых приведены в настоящем документе для последовательностей петли длиной 8 остатков и 10 остатков. Согласно некоторым другим вариантам реализации при редизайне N-конца HR1 можно применять генерическую последовательность петли, содержащую 2 – 7 tandemных повторов GS ((GS)_n; SEQ ID NO:23). Как продемонстрировано в настоящем документе (например, фиг. 2а), генерическая последовательность петли (GS)₄ (SEQ ID NO:24), как было показано, является эффективной при конструировании модифицированных иммуногенов gp140 из различных штаммов ВИЧ-1.

[0059] Помимо модификации N-конца HR1, некоторые полученные из gp140 белки для образования тримерного иммуногена ВИЧ-1 согласно настоящему изобретению также содержат замену сайта расщепления протеазой между gp120 и gp41 на последовательность линкера для получения нерасщепляемого белка gp140. В соответствии с примерами настоящего документа в иммуногенах на основе полученного из gp140 белка согласно настоящему изобретению можно применять различные линкеры сайта расщепления. Согласно различным вариантам реализации линкеры могут содержать различные остатки аминокислот варьирующей длины. Согласно некоторым вариантам реализации сайт расщепления длиной 4 остатка (т.е. остатки 508 – 511) заменяют последовательностью линкера. Например, сайт расщепления можно заменить линкером, содержащим один или несколько tandemных повторов мотива SGS. В качестве альтернативы, сайт расщепления можно заменить линкером (G₄S)₂ (SEQ ID NO:22). Согласно некоторым другим вариантам реализации последовательностью линкера заменяют более длинный участок, содержащий сайт расщепления (например, остатки 501 – 518). Согласно некоторым из данных вариантов реализации линкер содержит последовательность аминокислот длиной 8 остатков. Некоторые конкретные последовательности линкера, которые заменяют сайт расщепления в полученном из gp140 белке, представлены в SEQ ID NO:16-20. В соответствии с примерами настоящего документа комбинация последовательности линкера сайта расщепления и сконструированного посредством редизайна N-конца HR1 в иммуногенах gp140 согласно настоящему изобретению приводит к дополнительному улучшению выхода и чистоты тримера.

[0060] Согласно некоторым вариантам реализации связь между gp120 и gp41 можно стабилизировать посредством введения правильным способом расположенной межмолекулярной дисульфидной связи для получения растворимой формы Env, SOS gp140. Такой стабилизированный нативный комплекс Env увеличит время, в течение которого тримерный комплекс gp120-gp41 презентуется иммунной системе. Взаимодействия gp120-gp41 в SOS gp140 можно также стабилизировать посредством делеции первой и второй переменных (V1 и V2) петель и посредством введения замен аминокислот в N-концевой участок гептадного повтора вблизи положения 559 gp41 (см., например, публикацию WO 03/022869). Один такой модифицированный белок gp140 представляет собой SOSIP gp140, который содержит замену I559P. SOSIP gp140 является надлежащим способом свернутым, протеолитически расщепленным, по существу тримерным и характеризуется соответствующим связыванием с рецептором и антигенными свойствами. Стабильность и иммуногенность gp140 или других полученных из Env тримеров можно дополнительно усилить посредством презентующих тримеры форматов, описанных в настоящем документе.

[0061] Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный родственный gp140 белок может дополнительно содержать модифицированный гликановый сайт в остатке 332 (T332N). Согласно некоторым другим вариантам реализации модифицированный белок gp140, несущий сконструированный посредством редизайна N-конец HR1, также содержит другие мутации или изменения, введенные в сайт расщепления, например, замену REKR (SEQ ID NO:25) на RRRRRR (SEQ ID NO:26). Согласно различным вариантам реализации С-конец модифицированного белка gp140 может быть усеченным до остатка 664 или 681 (согласно номенклатуре HXB2), что приводит к получению двух версий gp140, как то «BG505 SOSIP.gp140.664» и «BG505 SOSIP.gp140.681», известных в данной области техники. Также в иммуногенах ВИЧ-1 согласно настоящему изобретению можно применять различные полученные из gp140 белки из различных клон или штаммов ВИЧ-1 (например, штаммов BG505 (клода А), JRFL (клода В) CAP45 (клода С), ZM109 (клода С), DU172.17 (клода С) и CH115.12 (клода В'/С), примеры которых приведены в настоящем документе). ВИЧ-1 можно классифицировать на четыре группы: «основная» группа М, «обособленная» группа О, группа N и группа Р. В пределах группы М существует несколько

различных с генетической точки зрения клад (или подтипов) ВИЧ-I. Тримеры gp140 для настоящего изобретения могут быть получены из любого подтипа ВИЧ, такого как группы M, N, O или P или клады A, B, C, D, F, G, H, J или K и т.п. Последовательности, кодирующие гликобелки Env ВИЧ-1, и способы манипулирования и встраивания таких последовательностей нуклеиновой кислоты в векторы, известны (см., например, публикацию HIV Sequence Compendium, Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (2003); базы данных последовательностей ВИЧ (hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/mainpage.html); Sambrook et al., Molecular Cloning: A 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;)). Также у большинства вирусов в оболочке, таких как вирус гриппа, Эбола и респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), существует участок типа HR1, который использует подобный механизм слияния типа 1. Стратегию получения иммуногенов gp140 ВИЧ-1 согласно настоящему изобретению можно также применять для стабилизации шипов Env при конструировании и получении иммуногенов вакцины для других вирусов в оболочке.

[0062] Как подробно описано ниже, полученный из gp140 белок можно конъюгировать с презентующей платформой (например, наночастицами или ВПЧ) посредством различных способов. Предпочтительно, конъюгацию обеспечивают посредством ковалентной связи, например, слияний или вставок белка. Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации последовательность белка слита с последовательностью презентующей платформы посредством последовательности линкера. В различные иммуногены согласно настоящему изобретению также можно ввести другие модификации в полученные из gp140 тримеры или в партнер конъюгации с целью улучшения стабильности или антигенности.

[0063] Различные полученные из gp140 белки, применяемые в настоящем изобретении, можно получить посредством протоколов или образовать в соответствии с протоколами, примеры которых приведены в настоящем документе, или с помощью способов, хорошо известных в данной области техники. После рекомбинантной экспрессии (например, в клетках HEK293 F, как подробно описано в настоящем документе) белки можно очистить посредством любой из общепринято применяемых на практике процедур. См., например, руководства

Guide to Protein Purification, ed. Deutscher, Meth. Enzymol. 185, Academic Press, San Diego, 1990; и Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer Verlag, New York, 1982. Существенная очистка обозначает очистку от других белков или компонентов клетки. По существу очищенный белок является по меньшей мере на 5 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 98% чистым. После очистки антигенность и другие свойства иммуногенов на основе тримера gp140, образованных из полученного из gp140 белка, можно также с легкостью изучить с применением стандартных способов, например, антигенного профилирования с применением известных шНАТ и антител, отличных от НАТ, дифференциальной сканирующей 10 калориметрии (ДСК), электронной микроскопии, анализа связывания посредством ELISA и биослойной световой интерферометрии (БСИ), а также анализа методом сокристаллографии в соответствии с примерами настоящего документа.

IV. Композиции размещенного на каркасе тримерного иммуногена ВИЧ-1

15 **[0064]** Помимо растворимых тримерных иммуногенов на основе gp140, описанных выше, в настоящем изобретении также предложены иммуногены ВИЧ-1, которые содержат гетерологичный каркас, презентирующий или содержащий тримерный полученный из Env белок. Согласно некоторым вариантам реализации гетерологичный каркас представляет собой наночастицу или вирусоподобную 20 частицу (ВПЧ). При получении композиций вакцины согласно настоящему изобретению можно применять различные платформы наночастиц. В целом, наночастицы, применяемые в настоящем изобретении, должны быть образованы из множества копий одной субъединицы. Дополнительно или в качестве альтернативы, аминоконец субъединицы частицы должен быть экспонирован и 25 должен находиться в непосредственной близости от оси симметрии третьего порядка, и расстояние между тремя аминоконцами должно точно соответствовать расстоянию между карбокси-концами различных тримерных компонентов ВИЧ-1. Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации иммуногены содержат самособираемые наночастицы диаметром приблизительно 20 нм или 30 менее (обычно собранные из 12, 24 или 60 субъединиц) и оси симметрии третьего порядка на поверхности частицы. Такие наночастицы обеспечивают подходящие платформы частиц для получения мультивалентных вакцин на основе тримера ВИЧ-1.

[0065] Согласно некоторым вариантам реализации наночастицы, презентующие тример ВИЧ-1, являются существующими в природе наночастицами, такими как ионные камеры ферритина, с осями симметрии третьего порядка на поверхности. Данные наночастицы обеспечивают презентацию множества копий тримерного компонента оболочки ВИЧ-1 (Env) и позволяют получать серию кандидатов мультивалентной вакцины на основе тримера. В качестве примера, одна из таких наночастиц представляет собой наночастицу ферритина из *Helicobacter pylori*. Ферритин представляет собой глобулярный белок, обнаруженный у всех животных, бактерий и растений. Он выступает, преимущественно, для контроля скорости и локализации образования полинуклеарного $\text{Fe(III)}_2\text{O}_3$ посредством транспортирования гидратированных ионов железа и протонов в минерализованную сердцевину и из нее. Глобулярная форма ферритина образована из мономерных субъединичных белков (также обозначаемых «мономерные субъединицы ферритина»), которые представляют собой полипептиды молекулярной массой приблизительно 17 – 20 кДа.

[0066] Мономерная субъединица ферритина, применяемая в настоящем изобретении, представляет собой полноразмерный единичный полипептид белка ферритина или любую его часть, способную направлять самосборку мономерных субъединиц ферритина в глобулярную форму белка. Последовательности аминокислот из мономерных субъединиц ферритина любого известного белка ферритина можно применять для получения слитых белков согласно настоящему изобретению, при условии, что мономерная субъединица ферритина способна к самосборке в наночастицу, экспонирующую эпитопы ВИЧ-1 на своей поверхности. Помимо ферритина, в настоящем изобретении можно также применять множество других самособираемых наночастиц с подобными молекулярными свойствами. Такие частицы 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 α B-кристаллин), 3CS0 (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*).

[0067] Согласно некоторым вариантам реализации наночастицы, презентующие тримерный иммуноген ВИЧ-1, представляют собой термостабильные 60-мерные наночастицы, например, дигидролипоил ацилтрансферазу (E2p) из *Bacillus stearothermophilus*. Согласно некоторым вариантам реализации, применяемые наночастицы могут представлять собой люмазинсинтазу (LS) из *Aquifex aeolicus*. E2p представляет собой полый додекаэдр диаметром 23,2 нм с 12 большими отверстиями, разделяющими трехмерные вершины на поверхности частицы. LS диаметром 14,8 нм представляет собой ансамбль из 60 субъединиц, упорядоченных в капсиде с икосаэдрической симметрией $T \frac{1}{4} 1$. В соответствии с примерами настоящего документа тримерные иммуногены, презентированные на данных наночастицах (например, E2p), характеризуются превосходными структурными и функциональными свойствами, включая оптимальный размер для прямого захвата ДК (дендритными клетками) и повышенное распознавание шНАТ.

[0068] Любые из полученных из Env тримерных белков ВИЧ-1 можно применять в композициях вакцины, презентированной на наночастицах. Согласно некоторым вариантам реализации наночастицы презентуют нативную тримерную форму гликобелков или доменов на основе Env ВИЧ-1, например, доменов gp140, gp120 или V1V2 в соответствии с примерами настоящего документа (см., например, таблицу 2). Согласно некоторым вариантам реализации наночастицы презентуют модифицированный тримерный иммуноген gp140, например, HR1-модифицированный тример gp140, описанный в настоящем документе. В качестве рецептор-связывающего белка gp120 Env ВИЧ-1 интенсивно исследовали в роли иммуногена вакцины, однако на сегодняшний день его считают неоптимальным в связи с экспонированием ненейтрализующей поверхности, заглубленной в нативный шип. Как продемонстрировано в настоящем документе, экспонирование полноразмерного gp120 на наночастицах ферритина и E2p может восстановить подобную нативной конформацию тримера при отсутствии gp41. Обладая подобной SOSIP антигенностью и вариациями размера частиц и расстояниями поверхности, данные наночастицы обеспечивают универсальные платформы для исследования вакцин против ВИЧ-1 на основе gp120.

[0069] Помимо этого, полученный из Env тримерный белок можно получить из различных штаммов ВИЧ-1. Согласно некоторым вариантам реализации

полученный из Env тример получен из штамма BG505 ВИЧ-1. В качестве примеров, наночастицы V1V2-ферритина были получены из тримерных белков штаммов ZM109 и CAP45 ВИЧ-1. Также в настоящем документе приведены примеры наночастиц (E2p или ферритина), экспонирующих тримеры gp140, 5 полноразмерный gp120, полноразмерный gp120 с дополнительной дисульфидной связью для стабилизации конца gp120, а также молекулы gp120 различных длин. Данные примеры свидетельствуют о том, что общую структуру наночастицы и стратегию дизайна, описанную в настоящем документе, можно применять для получения кандидатов мультивалентной вакцины против ВИЧ-1 на основе других 10 штаммов ВИЧ-1.

[0070] Согласно различным вариантам реализации наночастицу, экспонирующую любой из данных полученных из Env иммуногенов ВИЧ-1, можно сконструировать посредством слияния тримерного иммуногена с субъединицей наночастицы (например, субъединицей E2p или ферритина). Антигенность и 15 структурную целостность данных иммуногенов ВИЧ-1 на основе наночастиц можно с легкостью проанализировать посредством стандартных анализов, например, анализов связывания с антителом и электронной микроскопии (ЭМ) с негативным окрашиванием. В соответствии с примерами настоящего документа различные слитые молекулы могут самособираться в наночастицы, которые 20 экспонируют иммуногенные эпитопы полученного из Env тримера (например, gp140). Благодаря вызову наработки устойчивых тример-специфичных шНАТ, данные наночастицы являются подходящими для вакцинации индивидуумов против широкого диапазона вирусов ВИЧ-1.

[0071] Согласно некоторым вариантам реализации гетерологичный каркас, презентующий или содержащий тримерный белок, полученный из Env, 25 например, тримерный белок, полученный из gp140, описанный в настоящем документе, представляет собой вирусоподобную частицу (ВПЧ), такую как ВПЧ бактериофага Q_β в соответствии с примерами настоящего документа, или самособираемую наночастицу, которая характеризуется такими же 30 молекулярными и геометрическими свойствами, что и ВПЧ. В целом, ВПЧ, применяемая в настоящем изобретении, должна соответствовать по меньшей мере одному и, предпочтительно, всем из следующих критериев: **(1)** ВПЧ должна быть образована из множества копий одной субъединицы; **(2)** ВПЧ должна содержать

оси симметрии третьего порядка, экспонированные на поверхности; и **(3)** N-конец каждой субъединицы ВПЧ должен быть экспонирован и должен находиться в непосредственной близости от оси симметрии третьего порядка, и расстояние между тремя N-концами должно соответствовать расстоянию между С-концами

5 тримерного антигена ВИЧ-1 так, чтобы антиген ВИЧ-1 мог быть слитым с N-концом субъединицы ВПЧ. Или, в качестве альтернативы, ось симметрии третьего порядка должна быть окружена тремя петлями поверхности, каждая из субъединицы ВПЧ, причем антиген ВИЧ-1 может быть встроен в цепь субъединицы.

10 **[0072]** Согласно различным вариантам реализации иммуногены ВИЧ-1 на основе ВПЧ согласно настоящему изобретению могут содержать минимум 20 – 25 эпитопов, разделенных расстояниями 5 – 10 нм, которые являются достаточными для активации В-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации ВПЧ характеризуются диаметром 30 – 40 нм и содержат на поверхности оси симметрии

15 третьего порядка, которые обеспечивают идеальную платформу для разработки мультивалентных вакцин на основе тримера ВИЧ-1. Согласно некоторым вариантам реализации в иммуногенах ВИЧ-1 на основе ВПЧ можно применять любую из ВПЧ, идентифицированных авторами настоящего изобретения в результате биоинформатического анализа аннотированной базы данных капсидов

20 икосаэдрического вируса, VIPERdb (<http://viperdb.scripps.edu/>). Такие капсиды включают бактериофаг Q с кристаллической структурой 3,5Å (идентификационный номер базы данных белковых структур PDB: 1QBE), капсид вируса Флокхаус (flock house virus, FHV) с кристаллической структурой 3,5Å (идентификационный номер базы данных белковых структур PDB: 4FSJ), капсид

25 вируса Орсай (Orsay) с кристаллической структурой 3,25Å (идентификационный номер базы данных белковых структур PDB: 4NWV) в базе данных PDB (<http://www.rcsb.org/pdb>) и фактор активации В-клеток (B-cell activating factor, BAFF) с кристаллической структурой 3,0Å (идентификационный номер базы данных белковых структур PDB: 1JH5), которые образуют 60-мерный ансамбль, подобный ВПЧ. Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации бактериофаг Q применяют благодаря его оптимальным структурным свойствам. Дополнительные ВПЧ, подходящие для настоящего изобретения, можно с легкостью идентифицировать посредством биоинформатического поиска подобного ансамбля частиц и субъединичной структуры, как таковые,

30

идентифицированные для любой из данных иллюстративных ВПЧ. Например, для конструирования антиген-презентирующих платформ вакцины ВПЧ применяли бактериофаги MS2 (идентификационный номер базы данных белковых структур PDB: 2WBH) и P22 (2XYY и 2XYZ). ВПЧ данных двух бактериофагов также
5 можно применять для конструирования иммуногенов мультивалентной вакцины против ВИЧ-1 согласно настоящему изобретению.

[0073] Размещенные на мультивалентном каркасе тримерные иммуногены ВИЧ-1 согласно настоящему изобретению можно сконструировать в соответствии со способами, описанными в настоящем документе (например, в примерах 9 – 13).

10 В настоящем документе приведены примеры различных наночастиц, презентующих тримерные иммуногены ВИЧ-1. Такие примеры включают тримеры V1V2, презентированные на ферритине (SEQ ID NO:29-31), тримеры gp120, презентированные на ферритине (SEQ ID NO:32-34), тримеры gp120, презентированные на E2p или LS (SEQ ID NO:35-36), тримеры gp140,
15 презентированные на наночастицах ферритина (SEQ ID NO:37-39), и тримерные иммуногены gp140, презентированные на наночастицах LS или E2p (SEQ ID NO:40-41). В целом, для конструирования ВПЧ, презентующих тримерные иммуногены ВИЧ-1, последовательности тримера можно слить с последовательностью ВПЧ (например, на N-конце ВПЧ) или встроить в
20 последовательность ВПЧ. Согласно некоторым вариантам реализации ВПЧ слита на своем N-конце с полученным из Env ВИЧ-1 тримером, например, V1V2, gp120 ВИЧ-1, и на ВПЧ могут презентироваться две версии тримера SOSIP gp140, отмеченного выше. Согласно некоторым другим вариантам реализации полученный из Env тример ВИЧ-1 встраивают в ВПЧ. Согласно данным вариантам
25 реализации тример ВИЧ-1 может представлять собой домены V1V2 или белок gp120. Поскольку N- и C-конец gp140 находятся далеко друг от друга, данный полученный из Env тример не подходит для встраивания в ВПЧ. В соответствии с примерами настоящего документа были получены серии конструкций ВПЧ посредством слияния V1V2, gp120 ВИЧ-1 и двух версий SOSIP gp140 с
30 субъединицей Q посредством встраивания V1V2 в петли поверхности субъединиц FHV и Орсай и посредством встраивания V1V2 и gp120 в петлю поверхности BAFF. Как подробно описано в разделе примеров ниже, антигенность и сборку ВПЧ подтверждали для всех ВПЧ на основе Q с помощью анализов связывания с

антителом и электронной микроскопии (ЭМ) с негативным окрашиванием. Антигенность также подтверждали для ВПЧ на основе FHV, Орсай и BAFF.

V. Фармацевтические композиции и варианты терапевтического применения

5 [0074] В настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции и связанные способы применения иммуногенов ВИЧ-1 (например, растворимых полученных из gp140 белков или наночастиц, экспонирующих полученный из Env тример), описанных в настоящем документе, для предотвращения и лечения инфекций ВИЧ-1. Согласно некоторым вариантам реализации иммуногены, раскрытые в настоящем документе, включены в фармацевтическую композицию. 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 или
10 противовирусных лекарственных средств). В композиции также можно применять различные фармацевтически приемлемые добавки.

[0075] Некоторые фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению представляют собой вакцины. В случае композиций вакцины можно дополнительно включать соответствующие адъюванты. Примеры подходящих
20 адъювантов включают, например, гидроксид алюминия, лецитин, адъювант Фрейнда, MPLTM и ИЛ-12. Согласно некоторым вариантам реализации иммуногены ВИЧ-1, раскрытые в настоящем документе, могут быть приготовлены в состав в форме состава с контролируемым высвобождением или с замедленным высвобождением. Этого можно достичь в композиции, которая содержит полимер
25 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., например, руководства 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.

[0076] Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно с легкостью использовать во множестве вариантов терапевтического или

профилактического применения для лечения инфекции ВИЧ-1 или вызова иммунного ответа на ВИЧ-1 у субъекта. Например, композицию можно вводить субъекту для индукции иммунного ответа на ВИЧ-1, например, для индукции выработки нейтрализующих антител против ВИЧ-1 широкого спектра действия. В случае субъектов, подверженных риску развития ВИЧ-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. Иммуногенную композицию вводят в количестве, достаточном для индукции иммунного ответа против ВИЧ-1. Для вариантов терапевтического применения композиции должны содержать терапевтически эффективное количество иммуногена ВИЧ-1, описанного в настоящем документе. Для вариантов профилактического применения композиции должны содержать профилактически эффективное количество иммуногена ВИЧ-1, описанного в настоящем документе. Соответствующее количество иммуногена можно определить в зависимости от конкретного заболевания или состояния, лечение или предотвращение которого проводят, тяжести, возраста субъекта и других индивидуальных характеристик конкретного субъекта (например, общего состояния здоровья субъекта и надежности иммунной системы субъекта). При определении эффективных доз дополнительно руководствуются исследованиями на моделях на животных с последующими клиническими исследованиями на человеке и руководствуются протоколами введения, которые в значительной степени снижают возникновение или тяжесть симптомов заболевания- или состояний-мишеней у субъекта.

[0077] 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 инфекции. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации субъект, лечение которого проводят, представляет собой такового, который страдает от ВИЧ-инфекции или который подвержен риску развития ВИЧ-инфекции, например, в связи с воздействием или возможностью воздействия ВИЧ. После введения терапевтически эффективного количества раскрытых терапевтических композиций можно проводить мониторинг субъекта в отношении инфекции ВИЧ-1, симптомов, связанных с инфекцией ВИЧ-1, либо и того, и другого.

[0078] Для вариантов терапевтического применения иммуногенную композицию вводят во время или после манифестации симптома заболевания или инфекции, например, после развития симптома инфекции ВИЧ-1 или после постановки диагноза инфекции ВИЧ-1. Иммуногенную композицию можно, таким образом, вводить до ожидаемого воздействия вируса ВИЧ 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.

[0079] Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно объединить с другими средствами, известными в данной области техники для лечения или предотвращения ВИЧ-инфекций. Такие средства включают, например, антитела или другие противовирусные средства, такие как нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, такие как абакавир, АЗТ, диданозин, эмтрицитабин, ламивудин, ставудин, тенофовир, залцитабин, зидовудин и т.п., ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, такие как делавирдин, эфавиренц, невирапин, ингибиторы протеазы, такие как ампренавир, атазанавир, индинавир, лопинавир, нелфинавир, озампренавир, ритонавир, саквинавир, типранавир и т.п., и ингибиторы слияния белка, такие как энфувиртид, и т.п. Введение фармацевтической композиции и известных средств против ВИЧ можно осуществлять одновременно или последовательно.

[0080] Иммуногены вакцины против ВИЧ-1 или фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно обеспечить 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. В наборах может быть дополнительно обеспечена необязательная инструкция по применению.

ПРИМЕРЫ

- 5 **[0081]** Следующие примеры предложены для иллюстрации, а не ограничения настоящего изобретения.

Пример 1 Белковый дизайн на основе ансамблей для участка HR1

- 10 **[0082]** Авторы настоящего изобретения высказали предположение, что N-конец HR1 (остатки 548 – 568) является критической детерминантой метастабильности тримера ВИЧ-1, поскольку он готов к вытягиванию в течение слияния и неупорядочен во всех структурах тримера SOSIP, о которых сообщалось, за исключением одной, в которой N-конец HR1 все равно представляется менее упорядоченным по сравнению с окружающими участками
- 15 (фиг. 1a). Неупорядоченность сверху длинной центральной спирали HR1 представляет собой нечто неожиданное, поскольку данный участок находится в сердцевине комплекса Env; однако данный участок, как ожидают, подвергается рефолдингу и становится спиральным в форме после слияния, как в эквивалентном участке гемагглютинаина гриппа и в других вирусных белках слияния типа 1
- 20 (Wilson et al., Nature 289, 1981), и вследствие этого является менее упорядоченным в состоянии до слияния или по меньшей мере принимает полностью отличную конформацию. В дизайне SOSIP помимо сконструированной дисульфидной связи (A501C/T605C) для дестабилизации состояния после слияния вводили мутацию I559P, и она являлась критически важной для продукции высококачественного
- 25 белка Env; это однозначно поддерживало идею о том, что участок HR1 должен быть связан с метастабильностью Env.

- 30 **[0083]** В данном исследовании изгиб HR1 подвергали рациональному редизайну, целью которого являлась стабилизация конформации, которую он имеет до слияния, а не просто дестабилизация конформации после слияния, как в тримере BG505 SOSIP.664 (фиг. 1b). Хотя данный участок HR1 дикого типа (ДТ) состоит из 21 остатка, расстояние C α между G547 и T569 составляет всего 24,8Å, что соответствует остову полностью вытянутого полипептида, состоящего всего из 6,3 остатков. В данном исследовании авторы настоящего изобретения решили

изучить две длины петли – 8 и 10 аминокислот – для редизайна HR1, допуская незначительную степень подвижности, при этом кардинально укорачивая петлю HR1 ДТ. Авторы настоящего изобретения применяли белковый дизайн на основе ансамблей (см. раздел способов) для идентификации последовательностей, которые могут стабилизировать структуру тримера в состоянии до слияния (фиг. 1с). Учитывая указанную длину петли, был получен большой ансамбль конформаций остова для соединения разрыва между G547 и T569 (фиг. 3а). В случае петель длиной 8 остатков среднеквадратическая флуктуация (СКФ) $C\alpha$ варьировала от 1,3 до 5,7 Å со средним значением 2,3Å, тогда как для петель длиной 10 остатков было выбрано большее конформационное пространство со средней СКФ $C\alpha$, составляющей 3,6Å (фиг. 3b). После исчерпывающего отбора в пространстве последовательностей все варианты дизайна ранжировали в зависимости от показателей их энергии (фиг. 3с). По 5 последовательностей с наивысшими показателями для каждой длины петли, в сумме 10, направляли на экспериментальное подтверждение (фиг. 3d).

Пример 2 Биохимическая и биофизическая характеристика вариантов редизайна HR1

[0084] Как продемонстрировано для тримеров SOSIP, sc-gp140 и NFL, биохимические и биофизические свойства обеспечивают первоначальную оценку вариантов дизайна тримеров. Используя аналогичную стратегию, авторы настоящего изобретения оценивали 10 тримеров BG505 со сконструированным посредством редизайна HR1, содержащих те же мутации T332N (для восстановления эпитопа N332), SOS (A501C/T605C) и R6, что и тример SOSIP.664 (за исключением I559P). Как отмечалось, различные протоколы очистки могут позволить получить тримеры различного качества. В данном исследовании авторы настоящего изобретения адаптировали достаточно простой протокол с применением материалов, которые легко доступны большинству исследователей и которые могут быть масштабированы при промышленном применении. Все конструкции временно экспрессировали в клетках HEK293 F, котрансфицированных фурином, как описано ранее (Sanders et al. PLoS Pathog. 9, e1003618, 2013). Секретированные белки Env очищали с применением колонки с лектином *Galanthus nivalis* (*Galanthus nivalis* lectin, GNL) с последующим одним

этапом очистки методом ЭХ на колонке Superdex 200 10/300. Экспрессия объемом один литр позволила получить достаточные количества (3 – 7 мг) тримеров со сконструированным посредством редизайна HR1 по сравнению с тремя отдельными экспрессиями объемом два литра для тримера SOSIP. Несмотря на то что очистка на GNL не привела к получению самых чистых тримеров, данный подход позволил провести сравнение основных свойств различных конструкций тримера, таких как мономер/димер и мультимерные фрагменты высшего порядка, которые в противном случае были бы отфильтрованы более совершенными способами очистки.

[0085] Авторы настоящего изобретения сравнивали профили ЭХ на основании простых показателей с применением значений поглощения в ультрафиолете при 280 нм (УФ). УФ-значение пика тримера использовали в качестве показателя выхода тримера, причем пики агрегатов и димера/мономера измеряли в виде отношения их УФ-значений к таковому пика тримера. Экспрессия SOSIP объемом два литра продемонстрировала среднее УФ-значение для пика тримера, составляющее 371, со средними отношениями 31% и 49% для пиков агрегатов и димера/мономера, соответственно. Пять вариантов редизайна HR1 длиной 8 остатков (названные редизайн HR1 1 – 5, соответственно) продемонстрировали в значительной степени увеличенный выход тримера с уменьшенными пиками агрегатов и димера/мономера в профилях ЭХ. В целом, варианты редизайна HR1 1 и 2, как представляется, характеризовались наилучшими свойствами в данной группе. Например, редизайн HR1 2 продемонстрировал увеличение УФ-значения пика тримера практически в два раза со снижением УФ-значений для пиков агрегатов и димера/мономера на 16% и 22% по сравнению с SOSIP, что свидетельствует об улучшении как выхода, так и чистоты тримера. Пять вариантов редизайна HR1 длиной 10 остатков (названные редизайн HR1 6 – 10, соответственно) демонстрировали подобную тенденцию, однако улучшение было менее выраженным. Несмотря на это, редизайн HR1 10 продемонстрировал УФ-значение для пика тримера, сравнимое с тримером SOSIP из экспрессии объемом два литра, с таким же низким уровнем нежелательных фрагментов E_{npv}, как и варианты редизайна HR1 1 и 2. Данный результат согласовывался с данными анализа методом голубого нативного электрофореза в полиакриламидном геле (ГН-ПААГ), которые продемонстрировали более концентрированные полосы тримера на геле. Фракции, содержащие тример, элюировали при 10,25 – 10,75 мл

для первоначальной оценки термической стабильности методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Для всех 10 исследованных вариантов редизайна HR1 в профилях ДСК наблюдались подобные пики нарушения фолдинга со срединной точкой термической денатурации (T_m),
5 варьирующей от 65,7 до 69,2°C, близкой к T_m 68,1°C, о которой сообщали для тримера SOSIP.

[0086] В целом, укорачивание и редизайн данного участка HR1 оказывали положительный эффект в отношении композиции полученных белков Env. Помимо увеличения выхода тримера и снижения содержания других фрагментов
10 Env, варианты редизайна HR1 сохранили термическую стабильность родительского тримера SOSIP.664; полученные результаты поддерживают идею о том, что данный участок соединительной петли HR1 является ключевой детерминантой метастабильности тримера ВИЧ-1 в отношении экспрессии и присутствия нежелательных фрагментов Env.

Пример 3 Кристаллографический анализ двух репрезентативных вариантов редизайна HR1

[0087] Для кристаллографического анализа были выбраны варианты редизайна HR1 1 и 9. Две данные конструкции отличались не только длиной
20 сконструированной посредством редизайна петли (8 и 10 аминокислот), но также заметно отличались профилями ЭХ, причем редизайн 9 демонстрировал более высокие количества димера, что обеспечивало возможность исследовать то, как усечение HR1 и вариации дизайна влияют на структуру тримера gp140. В связи со строгим требованием гомогенности образца для кристаллизации авторы
25 настоящего изобретения приготовили тримеры SOSIP со сконструированным посредством редизайна HR1 и ДТ, как описано ранее в публикации Kong et al. Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr. 71, 2099-2108, 2015. Вкратце, все тримеры получали в отрицательных по *N*-ацетилглюкозаминилтрансферазе I (GnTI^{-/-}) клетках HEK293 S и очищали с применением аффинной колонки 2G12 с
30 последующей очисткой методом ЭХ на колонке Superdex 200 16/600. В случае тримера SOSIP ДТ в профиле ЭХ наблюдался заметный пик агрегатов высокой молекулярной массы с УФ-значением, составлявшим 58% от пика тримера, и меньшим пиком, содержащим мономерный gp140. Напротив, очищенные на 2G12 варианты редизайна HR1 продемонстрировали заметное улучшение выхода и

чистоты тримера. Следует особо отметить, что редизайн HR1 1 продемонстрировал практически необнаруживаемый уровень мономера gp140, тогда как редизайн HR1 9 все еще содержал небольшую фракцию мономера. Несмотря на это профили ЭХ тримеров, экспрессированных в 293 S и очищенных на 2G12, соответствовали таковым тримеров, экспрессированных в 293 F и очищенных на GNL, описанных выше. Данный результат затем подтверждали методом ГН-ПААГ и термической стабильностью модифицированных тримеров, измеренной методом ДСК, что подтверждает, что улучшенные свойства тримера являются сущностной характеристикой вариантов редизайна HR1, не зависящей от систем экспрессии и очистки.

[0088] Сокристаллизация с антиген-связывающими фрагментами (Fab) PGT128 и 8ANC195 позволила получить комплексные структуры с разрешениями 6,9 и 6,3Å для тримеров со сконструированным посредством редизайна HR1 длиной 8 и 10 остатков, соответственно (таблица 1). В целом, сконструированные посредством редизайна тримеры продемонстрировали практически идентичные структуры таковым тримера SOSIP в данном умеренном решении, со среднеквадратическими отклонениями (СКО) $C\alpha < 0,25\text{\AA}$. Таким образом, результаты подтвердили, что тримеры gp140 с укороченным и сконструированным посредством редизайна HR1 все еще принимают подобную SOSIP структуру в состоянии до слияния. Ограниченные разрешением, авторы настоящего изобретения могли определить только примерную конформацию остова сконструированной посредством редизайна петли HR1, которая позволяла предположить, как данные два различных варианта дизайна стабилизируют тример в состоянии до слияния. Авторы настоящего изобретения высказали предположение, что укороченная длина петли (8 или 10 вместо 21 аминокислоты) и сконструированной посредством редизайна последовательности нарушала гептадный мотив и стабилизировала состояние до слияния. Более того, оба варианта редизайна HR1 содержали пролины в положениях 2 и 6 в петле длиной 8 остатков и в положении 8 в петле длиной 10 остатков, которые, вероятно, повышали жесткость остова. Следует отметить, что Asp 6 в редизайне HR1 9 готов к образованию солевого мостика с Arg 579 соседней спирали HR1, стабилизирующего слегка повернутую петлю. В заключении, gp140, как представляется, является в высокой степени устойчивым к редизайну HR1, что

значительно усиливает эффективность продукции белка без снижения общей структурной целостности.

Пример 4 Антигенное профилирование тримеров gp140 BG505 со сконструированным посредством редизайна HR1

[0089] Тример BG505 SOSIP.664 представляет собой близкий миметик нативного шипа при иммунном распознавании антителами. В данном исследовании авторы настоящего изобретения поставили целью изучить, будет ли редизайн HR1 оказывать влияние на связывание тримера Env с шНАТ или влияние на связывание с антителами, отличными от НАТ, с применением биослойной интерферометрии (БСИ) и иммуноглобулина G (IgG). Авторы настоящего изобретения снова исследовали тримеры, полученные с применением простой очистки на GNL, чтобы можно было с легкостью сравнить основные свойства различных конструкций тримеров. Анализ методом ГН-ПААГ фракций ЭХ, полученных на колонке Superdex 200 16/600, с последующей очисткой на GNL проводили для облегчения отбора надлежащим способом свернутых тримеров с целью антигенного профилирования. В данном контексте авторы настоящего изобретения также характеризовали редизайн HR1 1 методом ЭМ с негативным окрашиванием. В состоянии без лиганда реконструкция 22Å продемонстрировала морфологически близкое сходство с таковой для тримера SOSIP, полученного с применением того же протокола. Согласованность кристаллической структуры и структуры ЭМ дополнительно подтвердила целостность тримеров со сконструированным посредством редизайна HR1 перед антигенной характеристикой.

[0090] Сначала авторы настоящего изобретения измеряли связывание тримера с панелью репрезентативных шНАТ. Авторы настоящего изобретения применяли направленные на вершину V1V2 четвертичные шНАТ PGDM1400, PGT145 и PG16 для исследования того, являлась ли тримерная структура со связанным гликановым щитом подобной нативной. В случае PGDM1400 варианты редизайна HR1 1 и 9 продемонстрировали более быстрые скорости ассоциации и диссоциации по сравнению с SOSIP ДТ со сравнимой KD ($K_{\text{диссоциации}}/K_{\text{ассоциации}}$), составлявшей от 7 до 11 нМ. Аналогичный характер наблюдался для PG16 и PGT145. В случае VRC01, представителя класса направленных на сайт связывания CD4 (CD4-binding

site, CD4bs) шНАТ, все три тримера продемонстрировали практически идентичные профили связывания; это свидетельствует, что редизайн HR1 оказывает незначительный эффект в отношении презентации данного консервативного сайта уязвимости. Аналогичный характер также наблюдался в случае НАТ b12, которое ангажирует CD4bs с отличными углами сближения по сравнению с VRC01. В случае шНАТ, нацеленных на стебель V3 и окружающие его гликаны (PGT121, PGT128 и PGT135) и гликановый кластер gp120 с высоким содержанием маннозы (2G12), все три тримера продемонстрировали идентичные профили связывания; это свидетельствует, что данные гликановые эпитопы остались интактными после редизайна HR1. Наконец, авторы настоящего изобретения измеряли связывание тримера с двумя шНАТ, которые распознают конформационные эпитопы, охватывающие участки в gp120 и gp41. Все три тримера сильно связывались с PGT151 с быстрой скоростью ассоциации и пологой кривой диссоциации с незначительными различиями, наблюдаемыми в кинетике связывания 35O22.

[0091] Затем авторы настоящего изобретения измеряли связывание тримера с панелью репрезентативных антител, отличных от НАТ. Все три исследованных тримера связывались с CD4bs-специфичными МАТ (моноклональными антителами) b6 и F105. Тримеры со сконструированным посредством редизайна HR1 демонстрировали более слабое связывание с F105, чем тример SOSIP, с незначительно более быстрой скоростью диссоциации, обнаруженной для редизайна HR1 1. Однако в случае b6 отличия в кинетике не наблюдались. В случае двух V3-специфичных МАТ, 19b и 447-52D, все три тримера продемонстрировали быструю ассоциацию и медленную диссоциацию, что свидетельствует о некотором экспонировании V3; это подтверждалось методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с применением очищенного на 2G12 тримера SOSIP. Ранее было обнаружено, что согласно результатам метода ELISA 19b связывается с тримером SOSIP, однако согласно результатам методом ЭМ – связывается с тримером SOSIP лишь в ограниченной степени. Несмотря на это, экспонирование V3 можно минимизировать посредством конформационной фиксации, как продемонстрировали недавно для тримера SOSIP. Затем авторы настоящего изобретения исследовали два МАТ, нацеленных на иммунодоминантные эпитопы в кластере I gp41_{ECTO}, F240 и 7B2. Тример SOSIP, как представляется, связывался с обоими МАТ на низком уровне с незначительным предпочтением в отношении F240. Интересно отметить, что два варианта редизайна HR1 продемонстрировали

сниженное связывание с F240 и ничтожное связывание с 7B2; это свидетельствует о более закрытом или менее гибком gp41_{ECTO}. Авторы настоящего изобретения также исследовали связывание двух МАТ против CD4i, 17b и A32. Все три тримера не продемонстрировали связывание с 17b при отсутствии sCD4, причем редизайн HR1 1 демонстрировал исключительно минимальный уровень распознавания A32 несмотря на то, что все тримеры слабо связывались с данным МАТ.

[0092] В целом, два варианта редизайна HR1 демонстрировали в общих чертах подобный характер распознавания их шНАТ, за исключением измененной кинетики в случае направленных на вершину четвертичных шНАТ. Несмотря на то, что все три тримера продемонстрировали некоторое экспонирование V3, два варианта редизайна HR1, как представляется, более эффективно защищали ненейтрализующие эпитопы gp41_{ECTO}. Наблюдаемое связывание с антителами, отличными от НАТ, можно объяснить применением IgG вместо Fab и отличной стратегией иммобилизации в эксперименте БСИ.

Пример 5 Замена сайта расщепления фурина короткими линкерами

[0093] Sharma с соавт. недавно сообщили о подобном нативному, независимом от расщепления тримере gp140, который был обозначен NFL (Cell Rep. 11, 539-550, 2015). В отдельном исследовании Georgiev с соавт. заменили сайт расщепления между gp120 и gp41 на линкеры размером до 20 остатков, обозначенные sc-gp140 (J. Virol. 89, 5318-5329, 2015). Несмотря на то, что было высказано предположение о присутствии в тримерах sc-gp140 с короткими линкерами aberrantных структур, точный эффект модификации сайта расщепления в отношении фолдинга и структуры gp140 оставался неясным. В данном исследовании авторы настоящего изобретения устранили данную критически важную проблему в контексте редизайна HR1 1, что было подтверждено как с точки зрения структуры, так и с точки зрения антигенности (фиг. 2 и 3).

[0094] Сначала авторы настоящего изобретения исследовали результат замены участка, содержащего сайт расщепления (остатки 500 – 519), сконструированной посредством редизайна соединительной петлей между gp120 и gp41. Расстояние C α между R500 и F519 составляет 16,8 Å, что эквивалентно полностью вытянутому остоу из 4,4 остатков. Белковый дизайн на основе ансамблей позволил получить большой пул петель длиной 8 остатков,

соединяющих R500 и F519 (фиг. 4a). Следует отметить, что данная стратегия дизайна являлась достаточно агрессивной в том смысле, что данные петли могут упаковываться отлично от нерасщепленной последовательности ДТ в связи с усечением длиной 10 остатков в данном участке и исключением мутации SOS, поскольку A501 теперь являлся частью участка, который подвергали редизайну (с обращенной мутацией T605C). Аналогично редизайну HR1, 5 вариантов дизайна с наивысшими показателями (называемые CST1-5, фиг. 4b) после временной экспрессии в клетках HEK293 F без фурина с последующей очисткой на GNL характеризовали методом ЭХ. В целом, CST1-5 продемонстрировали сниженный выход тримера, а также увеличенное содержание агрегатов по сравнению с родительским редизайном HR1, о чем свидетельствовало более высокое плечо слева от основного пика тримера в профилях ЭХ. В случае всех 5 вариантов редизайна CST при анализе методом ГН-ПААГ наблюдалась дополнительная полоса, что свидетельствует о присутствии в продуцированных белках неохарактеризованных фрагментов Env (фиг. 4с).

[0095] Затем авторы настоящего изобретения исследовали эффект замены сайта расщепления (₅₀₈REKR₅₁₁) почти полноразмерным линкером SGS (называемым CSF). Интересно отметить, что CSF продемонстрировал заметное снижение пика агрегатов в профиле ЭХ по сравнению с CST1-5, которое дополнительно улучшалось в результате добавления обратной мутации SOS (называемой CSF-SOS). Аналогично CST1-5, в случае тримера CSF в анализе методом ГН-ПААГ фракции, содержащей тример, после очистки методом ЭХ на колонке Superdex 200 16/600 наблюдалась дополнительная полоса, что свидетельствует об общем характере, свойственном коротким линкерам сайта расщепления. Для идентификации данного неизвестного фрагмента Env авторы настоящего изобретения применяли метод ЭМ с негативным окрашиванием с целью получения 3D-реконструкции для тримера CSF. Примечательно, что для не связанного с лигандом тримера наблюдались два различных типа морфологии: один – в состоянии до слияния (20Å) аналогично тримеру SOSIP и другой – в состоянии, отличном от состояния до слияния (17Å), о котором ранее не сообщалось. Данная конформация тримера, отличная от состояния до слияния, содержит вытянутый gp41 (приблизительно 40 – 45Å) и называется далее в настоящем документе «промежуточное состояние слияния». Реконструкции ~20Å методом ЭМ связанных с PGV04 тримеров CSF в двух различных состояниях

продемонстрировали некоторые незанятые плотности, которые невозможно было интерпретировать при данном разрешении. Напротив, для реконструкции методом ЭМ тримера CSF-SOS наблюдали одну конформацию как в не связанной с лигандом (21Å), так и в связанной с PGV04 форме (20Å). В заключении, анализ методом ЭМ свидетельствовал, что тримеры CST и CSF с короткими линкерами сайта расщепления содержат промежуточное состояние слияния, которое можно эффективно подавлять мутацией SOS.

[0096] Затем авторы настоящего изобретения исследовали связывание тримера CSF и CSF-SOS с небольшой панелью шНАТ и антител, отличных от НАТ.

В случае шНАТ авторы настоящего изобретения применяли PGDM1400, VRC01 и PGT151, нацеленные на вершину V1V2, CD4bs и поверхность взаимодействия gp120-gp41, соответственно. Тримеры CSF и CSF-SOS связывались с PGDM1400 с аналогичными профилями кинетики и аффинностями. Однако в связи с двумя смешанными формами тримера CSF продемонстрировал сниженное связывание по сравнению с CSF-SOS. CSF и CSF-SOS демонстрировали идентичные профили связывания с VRC01, аналогичные таковым тримера SOSIP; это свидетельствует о том, что в данных тримерах CD4bs доступен в равной степени. В случае PGT151 CSF и CSF-SOS продемонстрировали сниженное связывание с заметной скоростью диссоциации; это свидетельствует о том, что линкер между gp120 и gp41 может оказывать влияние на связывание PGT151. Также исследовали три МАТ, отличных от нейтрализующих. CSF более сильно связывался с направленным на CD4bs F105, чем CSF-SOS, в связи со смешанными промежуточными состояниями слияния. В случае направленного на V3 19b оба тримера CSF продемонстрировали подобные профили связывания относительно тримера SOSIP и редизайна HR1 1. Напротив, CSF продемонстрировал усиленное связывание с направленным на gp41 F240, которое эффективно снижалось в результате мутации SOS в CSF-SOS.

Пример 6 Замена сайта расщепления фурина длинными линкерами

[0097] На основании собственного анализа, проведенного к данному этапу, и сообщений относительно тримеров NFL и sc-gp140 авторы настоящего изобретения высказали предположение, что редизайн HR1 в сочетании с длинным линкером сайта расщепления может преодолеть тенденцию образования промежуточных состояний слияния и обеспечить нерасщепленный оптимизированный тример, в состоянии до слияния (uncleaved pre-fusion-

optimized, UFO). С данной целью авторы настоящего изобретения исследовали два тримера на основе редизайна HR1 1 и NFL-подобного линкера ($2 \times G_4S$). Две данные конструкции, называемые CSL и CSL-SOS, временно экспрессировали в клетках HEK293 F с последующей очисткой на GNL и методом ЭХ на колонке Superdex 200 16/600. Оба тримера CSL продемонстрировали целесообразные выходы с профилями ЭХ, аналогичными таковым тримеров CSF. В случае CSL несмотря на то, что на геле ГН не были определенно идентифицированы дополнительные полосы, полосы тримера, как представляется, являлись более диффузными, чем таковые, наблюдаемые в случае CSL-SOS. С целью получения дополнительных характеристик структур тримеров авторы настоящего изобретения получили реконструкции методом ЭМ для не связанных с лигандом тримеров CSL и CSL-SOS при разрешениях 17 и 20 Å, соответственно. Тример CSL продемонстрировал в некоторой степени отличную морфологию, чем тримеры SOSIP ДТ, редизайн HR1 1, CSF до слияния и CSF-SOS: плотность тримера CSL, как представляется, являлась более узкой в верхней части вершины тримера с дополнительными плотностями, выведенными наружу, и более широкой нижней частью вокруг gp41. Общая форма тримера CSL-SOS соответствовала таковой тримера CSF-SOS. Реконструкция ~ 20 Å связанных с PGV04 тримеров CSL и CSL-SOS напоминала таковую тримера SOSIP, что свидетельствует о стабилизации после связывания шНАТ. Взятые вместе, полученные результаты свидетельствуют, что длинный линкер сайта расщепления может снизить образование промежуточных состояний слияния, вероятно, за счет большей конформационной variability, о которой свидетельствует анализ методом ЭМ.

[0098] Авторы настоящего изобретения осуществили антигенное профилирование для тримеров CSL и CSL-SOS с применением той же панели шНАТ и антител, отличных от НАТ, что и для двух вариантов редизайна HR1. В случае направленных на вершину шНАТ PGDM1400, PG16 и PGDM145 два тримера CSL продемонстрировали аналогичную кинетику связывания и значения K_D с таковыми редизайна HR1 1. В случае направленного на CD4bs шНАТ (VRC01), НАТ b12 и гликан-реактивного шНАТ (PGT121, PGT128, PGT135 и 2G12) два тримера CSL продемонстрировали практически идентичные профили связывания с таковыми редизайна HR1 1 и тримера SOSIP. Как и ожидалось, наиболее заметное различие было обнаружено в случае шНАТ PGT151 и 35O22. В случае PGT151, которое связывается с эпитопом, состоящим из одного gp120 и

двух прилежащих gp41 в тримере, расщепленные тримеры со сконструированным посредством редизайна HR1 и тример SOSIP продемонстрировали пологие кривые диссоциации. Однако тримеры CSL продемонстрировали более быстрые скорости диссоциации, аналогичные таковым, наблюдаемым для тримеров CSF, что свидетельствует о последовательном эффекте, вызванном линкерами сайта расщепления. Напротив, в случае 35O22, которое связывается с gp120 и gp41 в одном промоторе gp140, скорости диссоциации, как представляется, не зависят от расщепления. В MAT F240 и 7B2 были выявлены менее доступные ненейтрализующие эпитопы на gp41 для CSL-SOS, но не для CSL, что согласуется с наблюдениями для двух тримеров CSF.

[0099] В заключении, NFL-подобный длинный линкер между gp120 и gp41, используемый в комбинации с оптимальным редизайном HR1, позволил получить нерасщепленный gp140, который сохранял наиболее желательные свойства тримера в состоянии до слияния. Проведенный авторами настоящего изобретения анализ длины линкера также позволил выявить комплексные последствия модификации сайта расщепления. Таким образом, в ходе дизайна тримерного иммуногена изменение длины линкера в сайте расщепления следует в каждом случае тщательно оценивать.

Пример 7 Редизайн генерического HR1 для стабилизации тримеров Env различных штаммов ВИЧ

[00100] Несмотря на то, что связывание сайта расщепления может вызывать осложнения, редизайн HR1, как представляется, оказывает общий положительный эффект в отношении структуры и антигенности тримера. В свете данного результата авторы настоящего изобретения пересмотрели стратегию редизайна HR1 посредством изучения применимости простого линкера GS (фиг. 2а). Такой «генерический» линкер HR1 (называемый HR1-G), если окажется эффективным, не только подтвердит роль данного участка HR1 в метастабильности Env, но также сделает возможной разработку стабильных тримеров для различных штаммов ВИЧ-1. С данной целью авторы настоящего изобретения исследовали генерический линкер HR1 применительно к BG505 клады А, JRFL клады В, DU172.17 клады С и рекомбинантному штамму CH115.12 В'/С (ранг 3) с их тримерами SOSIP, включенными в анализ для сравнения. Все конструкции тримеров временно экспрессировали в клетках HEK293 F с фурином с

последующей очисткой на GNL и методом ЭХ на колонке Superdex 200 10/300. В случае четырех исследованных штаммов генерический линкер HR1 продемонстрировал последовательное улучшение выхода и чистоты тримера (фиг. 2b). Наиболее существенное улучшение наблюдалось для штамма клады С: увеличение пика тримера на 46% относительно SOSIP ДТ с уменьшением пиков агрегатов и димера/мономера на 34% и 37%, соответственно. В случае данного штамма клады С два варианта редизайна HR1 с наивысшими показателями, полученные посредством белкового дизайна на основе ансамблей, привели к дополнительному увеличению пика тримера на ~50% с профилями ЭХ, идентичными таковым генерическому редизайну HR1, HR1-G. Результаты, таким образом, свидетельствуют о том, что генерический линкер HR1 обеспечивает общий принцип для стабилизации Env, при этом дополнительную оптимизацию свойств тримера можно достичь посредством компьютерного дизайна штамм-специфичным способом.

Пример 8 Некоторые иллюстративные способы для иммуногена ВИЧ-1 со сконструированным посредством редизайна HR1

[00101] Белковый дизайн на основе ансамблей *de novo*. Авторы настоящего изобретения разработали способ белкового дизайна на основе ансамблей *de novo* (фиг. 1с). С учетом структуры тримера (идентификационный номер базы данных белковых структур PDB: 4TVP) и указанной длины петли проводили трехэтапный процесс дизайна: (1) получали ансамбль (1000) конформаций остова для соединения двух заякоряющих остатков с применением алгоритма отбора петли в торсионном пространстве⁴⁸; (2) из пула 50 случайных последовательностей для каждого остова выбирали исходную последовательность на основании потенциала RAPDF⁴⁹ и подвергали 500 этапам модельного отжига в рамках метода Монте-Карло (Monte Carlo simulated annealing, MCSA) при температуре, линейно снижающейся с 300 до 10К; (3) для каждого остова записывали последовательность с наименьшей энергией, и все варианты дизайна, полученные в результате MCSA, по окончании процесса ранжировали в зависимости от энергии. 20 вариантов дизайна с наивысшими показателями проверяли вручную для облегчения выбора 5 кандидатов для экспериментального подтверждения.

[00102] Антитела для антигенного профилирования. Авторы настоящего изобретения применяли панель шНАТ и антител, отличных от НАТ, для

характеризации антигенности сконструированных тримеров. шНАТ 2G12 и b12, а также MAT F240, 7B2, 17b и A32 заказывали в рамках программы поставки реактивов для исследований СПИДа Национальных институтов здоровья США (NIH AIDS Reagent Program, <https://www.aidsreagent.org/>). Другие шНАТ и антитела, отличные от НАТ, были предоставлены D.S. (Defence Science, Научным управлением министерства обороны) и D.R.B. (Defense Research Board, Научно-исследовательским советом министерства обороны).

[00103] Экспрессия и очистка тримеров Env ВИЧ-1. Тримеры Env временно экспрессировали в клетках HEK293 F (Life Technologies, Калифорния), за исключением получения тримеров для кристаллографического анализа. Вкратце, клетки 293F оттаивали и инкубировали со средой для экспрессии FreeStyle™ 293 (Life Technologies, Калифорния) на шейкере-инкубаторе при температуре 37°C при 120 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). В случае тримеров SOSIP и тримеров со сконструированным посредством редизайна HR1 800 мкг плазмиды Env и 300 мкг плазмиды фурина 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, тогда как в случае нерасщепленных тримеров использовали 900 мкг плазмиды Env без фурина. После инкубации в течение 30 мин. к 1 л клеток 293F 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 Env экстрагировали из супернатантов с применением колонки с лектином *Galanthus nivalis* (GNL) (Vector Labs). Связанные белки элюировали ФБР (фосфатным буферным раствором), содержащим 500 mM NaCl и 1 M метил- α -D-маннопиранозид, а затем очищали методом эксклюзионной хроматографии (ЭХ) на колонке Superdex 200 Increase 10/300 GL для первоначальной оценки и на колонке HiLoad 16/600 Superdex 200 PG (GE Healthcare) для анализа методом ЭМ и антигенного профилирования. Концентрации белка определяли с применением УФ₂₈₀-поглощения с теоретическими коэффициентами экстинкции.

[00104] Голубой нативный (ГН) ПААГ. Белки Env анализировали методом голубого нативного электрофореза в полиакриламидном геле (ГН-ПААГ) и

окрашивали Кумасси голубым. Образцы белка смешивали с красителем для нанесения и наносили на 4 – 12% гель Bis-Tris NuPAGE (Life Technologies). Гели ГН-ПААГ анализировали в течение 2 часов при напряжении 150 В с применением буфера для анализа NativePAGE™ (Life Technologies) согласно инструкциям производителя.

[00105] Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Температурные кривые плавления тримеров SOSIP и тримеров сконструированным посредством редизайна HR1 получали с помощью калориметра MicroCal VP-Capillary (Malvern). Перед проведением анализа на приборе проводили замену буфера очищенных методом ЭХ гликобелков на однократный ФБР и концентрировали до 0,5 – 1 мкМ. Плавление исследовали при скорости сканирования 90 °С/ч. Обработку данных, включая корректировку с учетом буфера, нормирование и вычитание базовой линии, проводили с применением стандартизированного протокола программного обеспечения Origin 7.0.

[00106] Получение и очистка белка для кристаллизации. Два тримера сконструированным посредством редизайна HR1, а также Fab 8ANC195 и PGT128 получали и очищали, как описано в публикации Kong et al., *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* 71, 2099-2108, 2015. Вкратце, все конструкции клонировали в векторе экспрессии pHCMV3. Клетки млекопитающих Freestyle™ 293F временно трансфицировали Fab, и клетки GnT1^{-/-} 293 S временно трансфицировали тримерами. Через неделю после трансфекции супернатанты клеток, трансфицированных антителом, собирали и очищали с применением колонки Lambda или Карпа Capture Select (BAC BV) в случае PGT128 и 8ANC195, соответственно, перед последующей очисткой с применением метода ионообменной хроматографии и ЭХ. Супернатанты клеток, трансфицированных тримером, очищали с применением аффинной колонки 2G12 с последующей очисткой методом ЭХ. Комплексы тримеров, которые использовали для исследований кристаллизации, были получены посредством смешивания тримерных белков с Fab PGT128 и 8ANC195 при молярном соотношении 1,0:1,2:1,2 при комнатной температуре в течение 20 мин. Данную смесь затем дегликозилировали с применением эндогликозидазы H (EndoH) в 200 мМ NaCl, 50 мМ цитрате натрия, pH 5,5, при температуре 37 °С в течение 1 ч согласно

протоколу производителя (New England Biolabs) перед окончательной очисткой методом ЭХ.

[00107] Кристаллизация белка и набор данных. Два очищенных белковых комплекса, содержащих Fab PGT128 и 8ANC195, связанные с тримерами со сконструированным посредством редизайна HR1, были получены для кристаллизации посредством замены буфера на 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,2. Затем комплексы концентрировали до 5 мг/мл и пропускали через фильтр с размером пор 0,22 мкм перед скринингом кристаллов с применением робота IAVI/JCSG/TSRI CrystalMation (Rigaku) в JCSG. Аналогично ранее описанному комплексу, содержащему Fab PGT128 и 8ANC195, связанные с тримером SOSIP gp140, комплексы тримера со сконструированным посредством редизайна HR1/Fab кристаллизовались при температуре 25 °C в 0,05 M сульфате лития, 0,05 M сульфате натрия, 20% (масс./об.) ПЭГ 400 и 0,05 M Tris-HCl, pH 8,7 (условие JCSG Core Suite: JCSGI A03, Qiagen). Все кристаллы для сбора рентгенографических данных подвергали криопротекции посредством быстрого погружения в маточный раствор с добавлением 40% ПЭГ 400 перед мгновенным охлаждением в жидком азоте. В случае комплекса редизайна HR1 1 собирали данные о дифракции к разрешению 6,3 Å с пучком синхронного излучения 23ID-B на усовершенствованном источнике фотонов, преобразованном с помощью HKL-2000, индексировали в пространственной группе I23 с полнотой 100% и $\langle I \rangle / \langle \sigma_I \rangle$, составляющей 2,3 в ячейке с наивысшим разрешением. В случае комплекса редизайна HR1 9 собирали данные о дифракции к разрешению 6,9 Å с пучком синхронного излучения 12-2 на стэнфордском синхротронном источнике света, преобразованном с помощью HKL-2000, индексировали в пространственной группе I23 со 100% полнотой и $\langle I \rangle / \langle \sigma_I \rangle$, составляющей 1,3, в ячейке с наивысшим разрешением. Набор данных и статистическая обработка обобщены в таблице 1.

[00108] Определение и уточнение структуры. Структуры PGT128 и 8ANC195, связанные с тримерами gp140 со сконструированным посредством редизайна HR1, изучали методом молекулярного замещения с применением программного обеспечения Phaser и модели поиска, состоящей из комплекса с тримером SOSIP gp140, связанным с Fab PGT128 и 8ANC195 (идентификационный номер базы данных белковых структур PDB: 5C7K). Как было описано ранее, уточнение состояло из чередования циклов построения модели вручную с применением

программного обеспечения Coot-0.7 и автоматизированного уточнения, осуществляемого программой Phenix. С учетом ограниченного разрешения массивов данных для каждого остатка использовали группированное уточнение B -фактора. Более того, уточнение позиционной координаты проводили с применением эталонного модельного набора ограничений. Исходную модель для каждой автоматизированной сессии уточнения в программе Phenix определяли как эталонную модель для данной сессии. Наконец, модель в минимальной степени модифицировали, за исключением сайта редизайна HR1. Итоговые значения R_{cryst} и R_{free} составляли 28,1% и 32,2%, а также 28,4% и 32,2% для комплексных структур вариантов редизайна HR1 1 и 9, соответственно. Статистические данные итогового уточнения см. в таблице 1. Заглубленные области молекулярной поверхности анализировали с помощью пакета программ Molecular Surface Package (http://www.csb.yale.edu/userguides/graphics/msp/msu_local.html) с применением радиуса зонда 1,7 Å и стандартного вандерваальсового радиуса. Остатки Fab нумеровали согласно номенклатуре Кэбота, и gp140 нумеровали с применением стандартной конвенции HXBc2.

[00109] Подготовка образцов для электронной микроскопии. Тримеры gp140 сами по себе и в комплексе с PGV04 анализировали методом ЭМ с негативным окрашиванием. Аликвоту объемом 3 мкл, содержащую ~0,02 мг/мл тримеров, в течение 15 с наносили на покрытую углеродом ячеистую сетку 400 Cu, на которую подавали тлеющий разряд при 20 мА в течение 30 с, а затем негативно окрашивали 2% муравьинокислым уранилом в течение 30 с. Данные собирали с применением электронного микроскопа FEI Tecnai Spirit, работающего при 120 кВ, при дозе электронов ~30 $e^-/\text{Å}^2$ и 52000-кратном увеличении, что обеспечило размер пикселя 2,05 Å на плоскости образца. Изображения получали с помощью фотокамеры Tietz 4k × 4k TemCam-F416 CMOS с применением номинальной дефокусировки 1000 нм и пакета программ Leginon.

[00110] Обработка данных электронной микроскопии и реконструкция изображения. Частицы отбирали автоматически с помощью программного обеспечения DoG Picker и помещали в стек частиц с применением пакета программного обеспечения Appion. Исходные бессылочные двумерные (2D) средние значения классов рассчитывали с применением частиц, сгруппированных по две, посредством итерационного многомерного статистического анализа (MCA)/многоссылочного выравнивания (МСВ) и сортировали на классы. Частицы,

соответствующие тримерам или тримерам, связанным с PGV04, отбирали в субстек и группировали по две перед следующим циклом бессылочного выравнивания, которое проводили с применением итерационного MSA/MCB и программы Xmirr для кластеризации и 2D-выравнивания. С целью анализа качества тримеров (закрытый подобный нативному, открытый подобный нативному и ненативный) бессылочные 2D средние значения классов исследовали визуально с применением метрик, описанных в публикации Pugach *et al. J. Virol.* 89, 3380-3395, 2015). Модель общих линий *ab initio* рассчитывали на основании бессылочных 2D средних значений классов в симметрии наложения C3 в программе EMAN2. Затем данную модель улучшали по отношению к неочищенным частицам в течение дополнительных 25 циклов с применением программы EMAN (Ludtke *et al.*, J. Struct. Biol. 128, 82-97, 1999). Разрешения итоговых моделей определяли с применением порога объемной корреляции Фурье (Fourier Shell Correlation, FSC) 0,5.

[00111] Анализ связывания методом ELISA и биослойной световой интерферометрии (БСИ). Кинетику связывания тримера с шНАТ и антителами, отличными от НАТ, 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 составлял 200 мкл/лунку. Анализы проводили при температуре 30 °C в твердых черных 96-луночных планшетах (Geiger Bio-One). Для нанесения антитела на поверхность захватывающих биосенсоров против Fc человека (АНС) использовали 5 мкг/мл белка в однократном кинетическом буфере в течение 300 с. Перед анализом ассоциации антитела на биосенсоре с тримером Env в растворе в течение 200 с проводили этап получения базовой линии биосенсора в течение 60 с. В шести сериях титрования использовали двукратный градиент концентрации тримера, начиная с 200 нМ. 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 тримером, или сенсора без антитела, но инкубированного с тримером. Данные, полученные на приборе Octet, обрабатывали с применением программного обеспечения для получения данных fortéBio v.8.1. Экспериментальные данные аппроксимировали в отношении направленных на

вершину V1V2 шНАТ с применением глобальной модели подгонки 1:1 для определения значения K_D и других кинетических параметров.

Пример 9 Наночастицы ферритина, презентующие тримерный V1V2 с
5 вершиной, подобной нативной

[00112] Длина участка V1V2 gp120 варьирует от 50 до 90 остатков, причем 1 из 10 остатков является *N*-гликозилированным, образуя плотную гликановую защиту на Env ВИЧ-1. Кодируемые V1V2 гликановые эпитопы могут распознаваться шНАТ, такими как PG9/PG16, CH01-04, PGT141-145 и PGDM1400. Несмотря на 10 вариабельность последовательности, короткий сегмент с центром в N160 определяет специфичность для большинства известных V1V2-специфичных шНАТ. Кристаллическая структура размещенного на каркасе V1V2 в комплексе с PG9 была определена для двух штаммов клады C, CAP45 и ZM109, что позволило выявить мотив греческого ключа с цепями В и С, несущими два критически 15 важных гликана. ЭМ структуры PG9 и PGDM1400 в комплексе с тримером BG505 SOSIP.664 gp140 свидетельствовали, что данные два шНАТ направлены на вершину тримера с различными углами сближения, как описано, например, в публикациях Julien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 4351-4356, 2013; и Sok *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 17624-17629, 2014. В данном исследовании 20 авторы настоящего изобретения высказали предположение, что оси симметрии третьего порядка на наночастице ферритина можно применять для презентации V1V2 в тримерной конформации, подобной нативной, обнаруженной в крио-ЭМ и кристаллических структурах тримера SOSIP. Для исследования данной возможности авторы настоящего изобретения разработали две конструкции на 25 основе V1V2 ZM109 клады C: одна из них содержала все три дисульфидные связи (называемая V1V2Ext), а укороченная версия содержала две дисульфидные связи (называемая V1V2Sht), причем обе последовательности V1V2 были слиты с N-концом (D5) субъединицы ферритина (FR) (таблица 2а) (См., например, публикации Kanekiyo *et al.*, *Nature* 499, 102-106, 2013; и He *et al.*, *Sci. Rep.* 5, 12501, 30 2015). После аппроксимации С-конца тримерного V1V2 к N-концам субъединиц ферритина вокруг каждой оси симметрии третьего порядка на поверхности частицы структурное моделирование позволило получить среднеквадратические отклонения (СКО) $C\alpha$, составляющие 3,7 и 0,8 Å, для V1V2Ext-FR и V1V2Sht-FR,

соответственно. Последующий анализ выявил плотную гликановую поверхность для обеих наночастиц с диаметрами 16,6 и 14,3 нм для V1V2Ext-FR и V1V2Sht-FR, соответственно.

[00113] Две конструкции V1V2-ферритин и мономерный V1V2 временно экспрессировали в отрицательных по *N*-ацетилглюкозаминилтрансферазе I клетках (GnT1^{-/-}) HEK293 S и очищали с применением колонки с лектином *Galanthus nivalis* (GNL) с последующей очисткой методом ЭХ на колонке Superdex 200 10/300 GL. В случае обоих вариантов дизайна V1V2-FR профили ЭХ демонстрировали один пик, что свидетельствует о надлежащем образом образованных наночастицах; это подтверждали методом голубого нативного электрофореза в полиакриламидном геле (ГН-ПААГ). Затем для визуализации очищенных наночастиц авторы настоящего изобретения применяли ЭМ с негативным окрашиванием. Действительно, визуализация методом ЭМ продемонстрировала гомогенные частицы V1V2Ext-FR, которые делали возможным расчет двумерных (2D) средних значений классов. Аналогичные результаты были получены для частиц V1V2Sht-FR; это свидетельствует, что данным наночастицам свойственны гомогенность и чистота, несмотря на различия длины их V1V2 и количества содержащихся дисульфидных связей. Однако тримерные шипы V1V2 оказались диффузными в 2D средних значениях классов, что свидетельствует о некоторой подвижности. С целью исследования антигенности вершины V1V2 авторы настоящего изобретения измеряли связывание частицы с PG9, которое распознает V1V2 как в мономерной, так и в тримерной форме, и с PGDM1400, которое нацелено на вершину SOSIP-подобной конформации тримера. Анализ обеих наночастиц методом твердофазного иммуноферментного анализа (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) продемонстрировал усиленное связывание шНАТ в отношении мономерного V1V2, причем PGDM1400 демонстрировало предпочтительное связывание с V1V2Ext-FR. С применением биослойной интерферометрии (БСИ) и иммуноглобулина G (IgG) авторы настоящего изобретения характеризовали кинетику связывания V1V2 с шНАТ PG9 и PGDM1400 в мономерной форме и в форме частиц. Как и ожидалось, мономерный V1V2 связывался с PG9 с низкой аффинностью и продемонстрировал отсутствие связывания с PGDM1400. Напротив, V1V2Ext-FR связывались с обоими шНАТ с высокой аффинностью, но с различной кинетикой. В случае PGDM1400 V1V2Ext-FR продемонстрировали

чрезвычайно высокую скорость ассоциации, что свидетельствует о стабильной вершине, которая может быть с легкостью распознана данным направленным на вершину шНАТ. V1V2Sht-FR демонстрировали аналогичную V1V2Ext-FR кинетику связывания, но со сниженной аффинностью в отношении PGDM1400; это свидетельствует об антагонистическом эффекте укороченного V1V2 в отношении структуры и антигенности вершины, что согласуется с результатами анализа ELISA.

[00114] Результаты, полученные авторами настоящего изобретения, демонстрируют, что участок V1V2 Env ВИЧ-1 может быть презентируван в тримерной конформации, подобной нативной, на наночастицах ферритина. Следует отметить, что данная стратегия дизайна, вероятно, является штамм-независимой, поскольку наночастицы также наблюдали для V1V2Ext-FR, сконструированного на основе CAP45 клады C (фиг. 8b-8d). В целом, презентация тримерного V1V2 на частицах по существу улучшила его распознавание направленными на вершину шНАТ; это свидетельствует, что наночастицы V1V2 могут обеспечить перспективные альтернативы тримерам gp140 и сфокусировать В-клеточные ответы на данный четвертичный эпитоп.

Пример 10 Наночастицы ферритина, презентирующие тримерный V1V2 с подобной нативной вершиной

[00115] 60-мерную наночастицу LS, презентирующую сконструированную сердцевину gp120, в которой отсутствовали вариабельные петли (V1V2 и V3) и внутренний домен, применяли для нацеливания на предшественников зародышевой линии VRC01, шНАТ, направленных на сайт связывания CD4 (CD4bs). Однако структуры тримера SOSIP BG505 в комплексе с шНАТ PGV04 класса VRC01 позволили определить, что гликаны на соседнем промоторе gp140 также вовлечены в распознавание CD4bs, что свидетельствует об ограничении угла сближения тримерным контекстом. Важность ограничений тримером нейтрализации ВИЧ-1 затем была продемонстрирована на мышах с нокаутом Ig человека, у которых только тример SOSIP BG505, но не наночастица eOD-LS, вызывал ответы НАТ. На основании данных предшествующих исследований и результатов, полученных с наночастицами V1V2, авторы настоящего изобретения высказали предположение, что наночастицу ферритина можно применять для презентации полноразмерного gp120 и экспонирования всех кодируемых им

эпитопов шНАТ в конформациях, подобных нативной, равно как и для презентации тримера SOSIP gp140. Данная стратегия дизайна может позволить получить альтернативные иммуногены, которым не свойственны ограничения, присущие тримерам gp140, содержащим метастабильный gp41. Для исследования данной возможности авторы настоящего изобретения сконструировали три слитые конструкции ферритина на основе gp120 BG505 кланды А: gp120Ext-FR и gp120Sht-FR, которые содержали gp120 различной длины, тогда как gp120SS-FR содержали дополнительную дисульфидную связь, направленную на стабилизацию конца gp120 (таблица 2b). В случае gp120Ext-FR структурное моделирование выявило практически идеальное наложение С-конца gp120 (G495) и N-конца ферритина (D5) вокруг каждой оси симметрии третьего порядка на поверхности частицы, со СКО α 1,9 Å и диаметром полученной в результате наночастицы 26,2 нм.

[00116] Все три конструкции gp120-ферритин и мономерный gp120 временно экспрессировали в клетках HEK293 F. Секретированные белки очищали с применением колонки GNL с последующей очисткой методом ЭХ на колонке Superose 6 10/300 GL. Среди трех химерных конструкций gp120Sht-FR продемонстрировала наиболее выраженный пик частицы в профиле ЭХ. Следует отметить, что в случае gp120SS-FR пик частицы не наблюдался; это свидетельствует о неправильном сворачивании мутантного gp120. Анализ методом ГН-ПААГ выявил высокомолекулярные полосы для gp120Ext-FR и gp120Sht-FR, соответствующие полностью собранным наночастицам. Затем авторы настоящего изобретения применяли ЭМ с негативным окрашиванием для визуализации очищенных наночастиц gp120-FR. Гомогенные частицы наблюдались для gp120Ext-FR и gp120Sht-FR; для последней были рассчитаны 2D средние значения классов. Поскольку gp120Sht-FR демонстрировали более эффективную сборку частиц, с целью дополнительной характеристики наночастиц применяли метод крио-ЭМ, который продемонстрировал поверхность частицы, содержащую шипы gp120.

[00117] Для оценки антигенности наночастиц gp120 авторы настоящего изобретения измеряли кинетику связывания частицы с панелью репрезентативных шНАТ и антител, отличных от НАТ. Сначала авторы настоящего изобретения исследовали направленные на вершину шНАТ PG16 и PGDM1400. Как и ожидалось, мономер gp120 демонстрировал исключительно минимальное

связывание с PG16 и практически необнаруживаемое связывание с PGDM1400. Напротив, наночастицы gp120 продемонстрировали по существу усиленное связывание с обоими шНАТ с субнаномолярными аффинностями, причем gp120Sht-FR незначительно превосходили gp120Ext-FR. Данный результат подтверждает, что три gp120 вокруг каждой оси симметрии третьего порядка на наночастице ферритина могут в действительности формировать тримерные конформации, подобные SOSIP. В случае направленного на CD4bs VRC01 обе наночастицы продемонстрировали увеличенную скорость ассоциации с пологими кривыми диссоциации. Аналогичная тенденция наблюдалась для НАТ b12, нацеленного на тот же сайт. Эффект авидности, являющийся следствием мультивалентного экспонирования, являлся наиболее выраженным для шНАТ PGT121, нацеленного на основание V3 и окружающие его гликаны: хотя мономерный gp120 связывался с PGT121 на более низком уровне с быстрой скоростью диссоциации, обе наночастицы gp120 продемонстрировали усиленное связывание с более быстрыми скоростями ассоциации и пологими кривыми диссоциации. Затем авторы настоящего изобретения измеряли связывание частиц с антителами, отличными от нейтрализующих МАТ. В случае F105, которое предпочитает открытую конформацию gp120, мономерный gp120 демонстрировал высокие скорости ассоциации и диссоциации, тогда как наночастицы продемонстрировали более низкие скорости ассоциации и диссоциации, что может являться следствием стерического несоответствия, вызванного насыщенным экспонированием тримеров gp120. Однако наночастицы gp120 продемонстрировали усиленное распознавание V3-специфичного 19b по сравнению с мономерным gp120, что можно минимизировать посредством конформационной фиксации, как недавно было продемонстрировано для тримера SOSIP. Наконец, наночастицы gp120-FR продемонстрировали ничтожное связывание с МАТ против CD4i 17b вопреки заметному распознаванию данным МАТ мономерного gp120.

Пример 11 60-мерные наночастицы, презентующие тримерный gp120

[00118] Авторы настоящего изобретения также исследовали, можно ли применять 60-мерные наночастицы для презентации тримерного gp120. С целью исследования данной возможности авторы настоящего изобретения выбрали два термостабильных 60-мера с различными структурными свойствами – LS (Zhang et

al., *J. Mol. Biol.* 306, 1099-1114, 2001) и E2p (Izard et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1240-1245, 1999). Размер LS, диаметр которой составляет 14,8 нм, лишь незначительно больше ферритина (диаметр 12,2 нм). Структурное моделирование наночастицы gp120Sht-LS свидетельствовало, что поверхность LS будет
5 полностью покрыта 20 тримерными шипами gp120 с предполагаемым диаметром 28,7 нм. После временной экспрессии в клетках HEK293 F и очистки на GNL секретированный белок анализировали методом ЭХ. Однако в профиле ЭХ данной конструкции LS пик частицы не наблюдался. Согласованно с этим, анализ методом ГН-ПААГ продемонстрировал доминирующую полосу пентамера, которую
10 подтвердили анализом ЭМ с негативным окрашиванием. Вкратце, результаты, полученные авторами настоящего изобретения, свидетельствуют, что относительно небольшая наночастица LS не может являться оптимальной для экспонирования тримерных шипов полноразмерного gp120.

[00119] Затем авторы настоящего изобретения исследовали E2p, которая
15 представляет собой полый додекаэдр диаметром 23,2 нм с 12 большими отверстиями, разделяющими трехмерные вершины на поверхности частицы. Структурное моделирование позволило получить наночастицу gp120Sht-E2p диаметром 37,6 нм (таблица 2с), размер которой близок к оптимальному для прямого поглощения ДК. Экспрессированный в HEK293 F и очищенный на GNL белок gp120Sht-E2p анализировали методом ЭХ на колонке Superose 6 10/300 GL;
20 наблюдался характерный высокий высокомолекулярный пик, соответствующий химерным частицам E2p. Согласованно с этими результатами, анализ методом ГН-ПААГ продемонстрировал концентрированную полосу наночастицы на геле и более светлую низкомолекулярную полосу, которая свидетельствует о
25 диссоциированном тримере gp120-E2p. Затем авторы настоящего изобретения применяли ЭМ с негативным окрашиванием для характеристики сборки данного 60-мера и наблюдали большие гомогенные наночастицы. 2D средние значения классов выявили полые сети белка, подобные кристаллической структуре. Однако, хотя анализ методом ЭМ подтвердил надежность E2p в качестве платформы
30 наночастиц для больших и комплексных антигенов, таких как тримерный gp120, данный анализ также продемонстрировал неожиданные 2D средние значения класса, в которых отсутствовали шипы gp120. Из результатов анализа ЭМ самих по себе было неясно, сформировались ли тримерные шипы gp120, но остались подвижным в связи с большими расстояниями, или три gp120 вокруг каждой оси

симметрии третьего порядка не смогли собраться в стабильный тример. Для решения данной проблемы авторы настоящего изобретения измеряли связывание частицы E2p с небольшой панелью шНАТ и антител, отличных от НАТ, методом БСИ. Примечательно, что gp120Sht-E2p связывались с направленными на вершину шНАТ PG16 и PGDM1400 с субпикомолярными аффинностями. Большая скорость ассоциации и пологие кривые диссоциации свидетельствовали о подобных нативным вершинах, напоминающих таковые тримера SOSIP, но с дополнительным преимуществом авидности. Аналогично случаю наночастиц gp120-ферритин, авторы настоящего изобретения наблюдали увеличенное распознавание CD4bs и основания V3 шНАТ VRC01 и PGT121, а также НАТ b12. В случае МАТ, отличных от нейтрализующих, gp120Sht-E2p связывались с CD4bs-специфичным МАТ F105 и V3-специфичным 19b на уровне, аналогичном gp120Sht-FR, что свидетельствует об общем свойстве, характерном наночастицам gp120 вне зависимости от размера. Наконец, в случае МАТ против CD4i, 17b, наблюдалось исключительно минимальное связывание.

[00120] В качестве рецептор-связывающего белка Env ВИЧ-1 интенсивно исследовали в роли иммуногена вакцины, однако на сегодняшний день его считают неоптимальным в связи с экспонированием ненейтрализующей поверхности, заглубленной в нативный шип. Результаты, полученные авторами настоящего изобретения, свидетельствуют, что экспонирование полноразмерного gp120 с наночастицами ферритина и E2p может восстановить подобную нативной конформацию тримера при отсутствии gp41. Обладая подобной SOSIP антигенностью и вариациями размера частиц и расстояниями поверхности, данные наночастицы обеспечивают универсальные платформы для исследования вакцин против ВИЧ-1 на основе gp120.

Пример 12 Наночастицы ферритина, презентирующие стабилизированные тримеры gp140

[00121] Недавно сообщалось о дизайне и иммуногенности наночастицы ферритина, презентирующей тример BG505 SOSIP gp140 (Sliepen et al., Retrovirol. 12:82, 2015). Анализ данной наночастицы gp140 методом ELISA продемонстрировал заметное снижение связывания с направленными на вершину шНАТ PG9 и PGT145, а также с шНАТ, направленным на поверхность взаимодействия gp120-gp41, PGT151. Данный результат оказался в некоторой

степени неожиданным, учитывая антигенные профили, которые авторы настоящего изобретения наблюдали для наночастиц gp120 с применением БСИ. В данном исследовании авторы настоящего изобретения стремились объединить экспонирование тримера gp140 на ферритине с новым стабилизирующим дизайном, содержащим модифицированный изгиб HR1 (остатки 548 – 568, называемый редизайн HR1 1), и подробный анализ длины линкера и усечения gp41. Конструкции gp140, исследование которых проводили в данном эксперименте, включали: gp140, усеченный в положении 664 (gp140.664), gp140.664 с линкером длиной 10 остатков (gp140.664-10aa) и gp140, усеченный в положении 681 для включения MPER, с тем же линкером (gp140.681-10aa) (таблица 2d). Структурное моделирование частиц gp140 со сконструированным посредством редизайна HR1-ферритином выявило надлежащим образом разделенные шипы тримеров диаметрами 30,1, 35,7 и 40,1 нм для gp140.664-FR, gp140.664-10aa-FR и gp140.681-10aa-FR, соответственно.

[00122] Поскольку контаминантные фрагменты Env не могут быть устранены в ходе сборки частиц, чистота тримера gp140 будет оказывать значительное влияние на качество наночастиц gp140. С целью иллюстрации данной проблемы авторы настоящего изобретения сравнивали профили ЭХ тримера BG505 SOSIP и тримера gp140 со сконструированным посредством редизайна HR1, в которых наблюдались существенные отличия пиков агрегатов и димера/мономера, о чем свидетельствовало УФ-поглощение при 280 нм. Все наночастицы gp140-ферритина, включая дизайн на основе SOSIP, временно коэкспрессировали с фурином в клетках HEK293 F и очищали с применением GNL с последующей очисткой методом ЭХ на колонке Superose 6 10/300 GL. С применением ЭМ с негативным окрашиванием авторы настоящего изобретения сначала подтвердили сборку наночастиц SOSIP-ферритина. Очищенные на GNL белки gp140-ферритин, содержащие редизайн HR1 1, демонстрировали аналогичные профили ЭХ с высокими пиками тримера и димера/мономера относительно содержащего частицу пика при 8,5 – 10,5 мл. В случае gp140.664-10aa-FR, которые содержали больше наночастиц, анализ методом ЭМ выявил неизвестный фрагмент белка с гексагональной структурой, смешанный с агрегатами и надлежащим образом собранными частицами. Для улучшения чистоты частиц авторы настоящего изобретения исследовали применимость колонки Capto Core 700, которую использовали для очистки ВПЧ. После очистки с применением колонок Capto Core

700 и GNL для gp140.664-10aa-FR наблюдалось снижение пиков, отличных от пиков частиц, в профиле ЭХ. Согласованно с этим, были получены изображения ЭМ наивысшего качества со все еще присутствующими гексагональными структурами; это свидетельствует, что необходим способ очистки, специфичный в отношении Env ВИЧ-1. С данной целью авторы настоящего изобретения исследовали комбинированное применение аффинных колонок Capto Core 700 и 2G12, причем последнюю широко применяли для очистки тримеров SOSIP. В целом, gp140.664-10aa-FR все так же характеризовались наилучшими свойствами, демонстрируя более заметный пик частиц в профиле ЭХ с уменьшенным пиком тримера и отсутствием пика димера/мономера. Для всех трех конструкций содержащие частицы фракции анализировали методом ГН-ПААГ, который продемонстрировал высокомолекулярные полосы, соответствующие полностью собранным наночастицам gp140 по сравнению с отдельным тримером. Следует отметить, что данные полосы согласовывались с профилем ЭХ и расчетным сдвигом из полос частиц gp120-ферритина, в отличие от публикации Sliepen с соавт. В случае gp140.664-10aa-FR на поверхности с помощью метода ЭМ с негативным окрашиванием наблюдали гомогенные наночастицы с видимыми шипами. Стабильность наночастиц gp140.664-10aa-FR подтверждали посредством анализа образца, который был заморожен и оттаян, методом ЭМ. В случае gp140.664-FR и gp140.681-10aa-FR авторы настоящего изобретения также наблюдали надлежащим способом сформированные наночастицы при анализе методом ЭМ с негативным окрашиванием. Взятые вместе, результаты, полученные авторами настоящего изобретения, подтвердили сборку наночастиц gp140-ферритина и подчеркнули важность надлежащей очистки и характеристики при разработке наночастиц на основе gp140.

[00123] Авторы настоящего изобретения характеризовали антигенные профили наночастиц gp140 с применением БСИ и панели репрезентативных шНАТ с тримером со сконструированным посредством редизайна HR1, которые были включены в эксперимент в качестве контроля. Сначала для исследования вершины тримеров gp140, экспонированной на поверхности частицы, авторы настоящего изобретения применяли направленные на вершину V1V2 шНАТ PGDM1400, PGT145 и PGT16. Примечательно, что все наночастицы gp140 продемонстрировали субпикомолярные аффинности по сравнению с отдельным тримером с пологими кривыми диссоциации благодаря avidности. В случае шНАТ PGT121, нацеленного

на эпитоп V3 с центром в N332, наночастицы gp140 продемонстрировали аналогичные профили связывания с таковыми тримера со сконструированным посредством редизайна HR1 и увеличенную скорость ассоциации. В случае шНАТ VRC01, направленного на CD4bs, частицы gp140-ферритина демонстрировали медленную ассоциацию, аналогичную частицам gp120-ферритина. В случае шНАТ PGT151 и 35O22, нацеленных на поверхность взаимодействия gp120-gp41, авторы настоящего изобретения обнаружили усиленное распознавание, но с различной кинетикой. В случае PGT151 наблюдалась более быстрая скорость ассоциации при неизменном характере диссоциации. Напротив, в случае 35O22 наблюдалась увеличенная скорость ассоциации, которая сопровождалась быстрой диссоциацией. Вкратце, все три наночастицы gp140 продемонстрировали улучшенное распознавание шНАТ, за исключением VRC01; это свидетельствует, что перегруженное экспонирование тримеров gp140 на поверхности может оказывать наиболее значимое влияние на шНАТ класса VRC01, которые связываются с CD4bs с ограниченным углом сближения.

[00124] Затем авторы настоящего изобретения измеряли кинетику связывания наночастиц gp140 с антителами, отличными от НАТ. Примечательно, что сниженное связывание наблюдалось в случае специфичных к CD4bs МАТ F105 и b6 с более значимым снижением в случае b6. В случае специфичного к V3 МАТ 19b наблюдалась более медленная ассоциация с наночастицами gp140 по сравнению с тримером и наночастицами gp120, что свидетельствует о минимизированном экспонировании V3 в связи с насыщенным экспонированием тримеров gp140. В случае МАТ F240, нацеленного на иммунодоминантные эпитопы в кластере I gp41, наночастицы gp140 демонстрировали необнаруживаемое связывание по сравнению с остаточным связыванием, наблюдаемым в случае тримера со сконструированным посредством редизайна HR1. В случае тримера gp140 и наночастиц gp140 связывание с МАТ против CD4i 17b и A332 не было обнаружено. Наконец, авторы настоящего изобретения применяли направленные на МРЕР шНАТ 4E10 и 10E8 с целью исследования данного эпитопа gp41 в контексте gp140.681-10aa-FR. Неожиданно, несмотря на то, что данная наночастица связывалась с 4E10 с высокой скоростью ассоциации и пологой кривой диссоциации, она продемонстрировала исключительно минимальное связывание с 10E8, которое распознает конформационный эпитоп, расположенный за пределами сайта связывания 4E10. Как было обнаружено

посредством структурного моделирования, поскольку MPER является проксимальным относительно поверхности ферритина с расстоянием ≥ 10 нм от внешней поверхности, стерическое несоответствие может оказывать более значимое влияние на шНАТ, такие как 10E8, которые выбирают определенные конформации эпитопа.

[00125] Анализы, проведенные авторами настоящего изобретения, выявили критически важные характеристики сконструированных наночастиц gp140-ферритина. В отличие от публикации Sliepen с соавт., антигенное профилирование методом БСИ однозначно продемонстрировало усиленное распознавание шНАТ и сниженное связывание с антителами, отличными от НАТ. Результаты свидетельствуют, что данные наночастицы gp140 могут представлять собой превосходящие иммуногены для индивидуальных тримеров gp140 при вызове устойчивых В-клеточных ответов в отношении эпитопов шНАТ. Следует отметить, что присущая чистота тримера со сконструированным посредством редизайна HR1 играла важнейшую роль в продукции наночастиц с подобными нативным тримерами gp140, которые продемонстрировали SOSIP-подобные антигенные профили с заметным сниженным связыванием с антителами, отличными от НАТ.

Пример 13 60-мерная наночастица E2p, презентующая стабилизированный тример gp140

[00126] Основываясь на многообещающих результатах, полученных с наночастицами gp140-ферритина, авторы настоящего изобретения исследовали экспонирование тримера gp140 на частицах на двух 60-мерах, LS и E2p. Учитывая маленький размер LS, авторы настоящего изобретения сначала разработали конструкцию, содержащую линкер длиной 10 остатков между С-концом субъединицы LS и N-концом gp140 (таблица 2e). Структурное моделирование LS-10aa-gp140.664 позволило получить предполагаемый диаметр 39,2 нм. После коэкспрессии фурина в клетках HEK293 F и очистки на GNL химерный белок анализировали методом ЭХ и ЭМ с негативным окрашиванием, в ходе чего не были идентифицированы надлежащим способом сформированные наночастицы. Затем авторы настоящего изобретения провели исследование применимости 60-мерной наночастицы E2p посредством слияния BG505 gp140.664, содержащего

изгиб сконструированного посредством редизайна HR1, с N-концом сердцевинной субъединицы E2p (таблица 2e). Структурное моделирование свидетельствовало, что наночастица gp140.664-E2p диаметром 41,5 нм может экспонировать все эпитопы шНАТ, за исключением MPER. Клетки HEK293 F котрансфицировали конструкцией gp140.664-E2p с фурином с последующей очисткой на GNL и методом ЭХ на колонке Superose 6 10/300 GL. Несмотря на то, что общий уровень экспрессии был низким, наивысший пик в профиле ЭХ соответствовал крупным наночастицам E2p, что затем подтверждали в анализе методом ЭХ очищенного на 2G12 образца. Возможным объяснением улучшения эффективности сборки частиц является то, что связывание трех субъединиц gp41 может одновременно облегчить тримеризацию gp140 и сборку E2p. Анализ методом ГН-ПААГ продемонстрировал полосу в верхней части геля, характерную для высокомолекулярных наночастиц. В ходе анализа методом ЭМ наблюдали гомогенные наночастицы gp140.664-E2p с плотным слоем шипов тримера. Результаты, полученные авторами настоящего изобретения, таким образом, свидетельствуют, что gp140.664-E2p может формировать гомогенные наночастицы размера ВПЧ с желаемой структурной регулярностью тримеров gp140, готовых для иммунного распознавания.

[00127] Затем авторы настоящего изобретения характеризовали антигенность наночастицы gp140.664-E2p с применением панели шНАТ. В случае направленных на вершину PG16 и PGDM1400 gp140.664-E2p продемонстрировали медленную скорость ассоциации с пологими кривыми диссоциации и менее чем пикомолярными аффинностями. В случае направленного на CD4bs VRC01 gp140.664-E2p продемонстрировали заметное снижение связывания и пологие кривые диссоциации, напоминающие наночастицы gp140-ферритина, но более слабые. В случае шНАТ PGT121, которое связывается с гликановым эпитопом на стебле V3, авторы настоящего изобретения наблюдали подобную тримеру кинетику с незначительно сниженной скоростью ассоциации. В случае PGT151 и 35O22 gp140.664-E2p демонстрировали профили связывания, аналогичные таковым наночастиц gp140-ферритина. В целом, gp140.664-E2p продемонстрировали сниженное распознавание шНАТ, которые исследовали в данном анализе, с наиболее заметным изменением, наблюдаемым для VRC01, и наименьшим – для PGT151. Данный результат позволил предположить, что на наночастице E2p экспонировались ненативные конформации тримера gp140. Для решения данной критически важной проблемы авторы настоящего изобретения

исследовали связывание частицы с панелью антител, отличных от НАТ. В случае специфичного к CD4bs МАТ F105 авторы настоящего изобретения наблюдали ослабленное связывание с более быстрой диссоциацией относительно отдельного тримера. Более того, связывание 19b неожиданно продемонстрировало заметное снижение экспонирования V3 в отличие от усиления, наблюдаемого для всех других наночастиц gp120 и gp140. Наночастица gp140.664-E2p связывалась с МАТ против CD4i 17b на минимальном уровне, что согласуется с предшествующими наблюдениями для наночастиц gp140-ферритина. Однако в случае gp41-специфичного МАТ F240 gp140.664-E2p продемонстрировали незначительное увеличение связывания относительно тримера и наночастиц gp140-ферритина. Последующий анализ выявил ребро размером приблизительно 9Å, образованное трехмерными вершинами, для E2p по сравнению с ребром 20Å для ферритина; это свидетельствует, что короткий линкер мог вызвать некоторую деформацию в соединяющем участке gp41-E2p и следовательно, привести к менее благоприятной конформации gp41.

[00128] Наночастица gp140.664-E2p с оптимальным размером (40 – 50 нм) для захвата ДК может являться более предпочтительной для вызова мощных и длительных В-клеточных ответов, чем наночастицы gp140-ферритина. Учитывая эффективную сборку наночастиц gp140.664-E2p, возможно, что экспонирование gp140.681 на частицах можно обеспечить с применением E2p, что требует дальнейшего исследования. В заключении, проведенная авторами настоящего изобретения характеристика наночастицы gp140.664-E2p обеспечила важный этап в направлении развития высоковалентной ВПЧ-подобной вакцины против ВИЧ-1.

Таблица 1. Набор данных рентгеновской кристаллографии и уточнение статистики

Набор данных	Редизайн HR1 1+Fab 8ANC195 и PGT128	Редизайн HR1 9+Fab 8ANC195 и PGT128
Источник рентгеновского излучения	APS 23ID-D	SSRL 12-2
Длина волны (Å)	1,033	0,980
Пространственная группа	I23	I23
Параметры элементарной ячейки	$a = b = c = 266,3 \text{ Å}$ $\alpha = \beta = \gamma = 90,0^\circ$	$a = b = c = 262,0 \text{ Å}$ $\alpha = \beta = \gamma = 90,0^\circ$
Разрешение (Å)	50,0-6,30 (6,52-6,30) ^a	50,0-6,90 (7,15-6,90) ^a
Наблюдения	104,666	96,139

Уникальные отражения	6,914 (685) ^a	5,022 (496) ^a
Избыточность	15,1 (15,7) ^a	19,1 (20,3) ^a
Полнота (%)	100,0 (100,0) ^a	100,0 (100,0) ^a
$\langle I/\sigma_I \rangle^b$	17,9 (2,3) ^a	15,5 (1,3) ^a
R_{sym}^c	0,10 (2,09) ^a	0,16 (4,21) ^a
R_{pim}^c	0,04 (0,54) ^a	0,05 (0,81) ^a
$CC_{1/2}$	0,51 ^a	0,33 ^a
Уточнение статистики		
Разрешение (Å)	40,14-6,31 (6,79-6,31) ^a	47,83-6,92 (7,61-6,92) ^a
Отражения (рабочие)	6,208 (1,236) ^a	4,519 (1,135) ^a
Отражения (исследуемые)	684 (139) ^a	492 (109) ^a
$R_{\text{crist}}(\%)^c$	28,1	28,4
$R_{\text{free}}(\%)^d$	32,2	32,2
Среднее B -значение (Å ²)	350	292
B -значение Уилсона (Å ²)	356	407
СКО от идеальной геометрии		
Длина связи (Å)	0,004	0,004
Углы связи (°)	0,841	0,882
Статистика Рамачандрана (%) ^f		
Предпочтительные	95,1	95,2
Отклоняющиеся значения	0,2	0,1
Идентификационный номер базы данных белковых структур PDB		

^a Цифры в круглых скобках обозначают ячейку с наивысшим разрешением.

^b Рассчитано как среднее(I)/среднее(σI)

^c $R_{\text{sym}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_{hkl,i}$, где $I_{hkl,i}$ представляет собой масштабированную интенсивность i -ого измерения отражения h, k, l , $\langle I_{hkl} \rangle$ представляет собой среднюю интенсивность для данного отражения, и n представляет собой избыточность. R_{pim} представляет собой независимую от избыточности меру качества измерений интенсивности. $R_{\text{pim}} = \sum_{hkl} (1/(n-1))^{1/2} \sum_i |I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_{hkl,i}$, где $I_{hkl,i}$ представляет собой масштабированную интенсивность i -ого измерения отражения h, k, l , $\langle I_{hkl} \rangle$ представляет собой среднюю интенсивность для данного отражения, и n представляет собой избыточность.

^d $R_{\text{crist}} = \sum_{hkl} |F_o - F_c| / \sum_{hkl} |F_o| \times 100$

^e R_{free} рассчитывали как для R_{crist} , но на исследуемой выборке, содержащей 10% данных, исключенных из уточнения.

^f Данные значения рассчитывали с применением сервера MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>).

Таблица 2. Последовательности аминокислот наночастиц, презентирующих тример ВИЧ-1.^a

Название конструкции	Последовательность аминокислот
----------------------	--------------------------------

a. Наночастицы ферритина, презентирующие тример V1V2	
ZM109 V1V2Ext-FR (SEQ ID NO:29)	[PCVKLTPLCVTLNCTSPA AHNESETRVKHCSFNITTDVKDRKQKVNATFYDLDIVPLSSSDNSSNSSLYRLISCNTSTITQACP]ASGDIIKLLNEQVNKEMQSSNL YMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS
ZM109 V1V2Sht-FR (SEQ ID NO:30)	<u>I</u> ACVTLNCTSPA AHNESETRVKHCSFNITTDVKDRKQKVNATFYDLDIVPLSSSDNSSNSSLYRLISCA <u>A</u> ASGDIIKLLNEQVNKEMQSSNL YMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS
CAP45 V1V2Ext-FR (SEQ ID NO:31)	[PCVKLTPLCVTLRCTNATINGSLTEE VKNC SFNITTEL RDKKQKAYALFYRPDVVPLNKNSPSGNSSEYILINCNTSTITQACP]ASGDIIKLLNEQVNKEMQSSNL YMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS
b. Наночастицы ферритина, презентирующие тример gp120	
BG505 gp120Ext-FR (SEQ ID NO:32)	[GVPVWKDAETTLFCASDAKAYDTEKHN VWATHACVPTDPNPQEIHLENVTEEFNMWKNNMVEQMHTDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLQCTNVTNNITDDMRGELKNCSFNMTTEL RDKKQKVYSLFYRLDVVQINENQGNRSNNSNKEYRLINCNTSAITQACP KVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCKDKKFNGTGPCPSVSTVQCTHG IKPVVSTQLLNGSLAEEVMIRSENITNNAKNILVQFNTPVQINCTRPNNNTRKSIRIGPGQAFYATGDIIGDIRQAHCNVSKATWNETLGKVVKQLRKHFNGNTIIRFANSSGGDLEVTTHSFNCGGEFFYCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSITLPCR I KQIINMWQRIGQAMYAPPIQGVIRCVSNITGLILTRDGGSTNSTTETFRPGGDMRDNWRSELYKYKVVKIEPLG]ASGDIIKLLNEQVNKEMQSSNL YMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNEHGLYLADQYVKGIAKSRKS
BG505 gp120Sht-FR (SEQ ID NO:33)	<u>I</u> GVPVWKDAETTLFCASDAKAYDTEKHN VWATHACVPTDPNPQEIHLENVTEEFNMWKNNMVEQMHTDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLQCTNVTNNITDDMRGELKNCSFNMTTEL RDKKQKVYSLFYRLDVVQINENQGNRSNNSNKEYRLINCNTSAITQACP KVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCKDKKFNGTGPCPSVSTVQCTHG IKPVVSTQLLNGSLAEEVMIRSENITNNAKNILVQFNTPVQINCTRPNNNTRKSIRIGPGQAFYATGDIIGDIRQAHCNVSKATWNETLGKVVKQLRKHFNGNTIIRFANSSGGDLEVTTHSFNCGGEFFYCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSITLPCR I KQIINMWQRIGQAMYAPPIQGVIRCVSNITGLILTRDGGSTNSTTETFRPGGDMRDNWRSELYKYKVVKIE <u>EG</u>]ASGDIIKLLNEQVNKEMQSS

NLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNE
 NNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDH
 AIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGL
 LYLADQYVKGIAKSRKS

BG505 gp120SS-FR
 (SEQ ID NO:34)

[GWCD AETTLFCASDAKAYDTEKHNWATHACVPTDPNPQE
 HLENVTEEFNMWKNNMVEQMHTDIISLWDQSLKPCVKLTPL
 CVTLQCTNVTNNITDDMRGELKNCSFNMTTEL RDKKQKVYS
 LFYRLDVVQINENQGNRSNNSNKEYRLINCNTSAITQACPKVS
 FEPIPIHYCAPAGFAILKCKDKKFNGTGPCPSVSTVQCTHGIK
 VVSTQLLLNGSLAEEVMIRSENITNNAKNILVQFNTVPVQINCT
 RPNNNTRKSIRIGPGQAFYATGDIIGDIRQAHCNVSKATWNET
 LGKVVKQLRKHFNGNNTIIRFANSSGGDLEVTTTHSFNCGGEFFY
 CNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSITLPCRICKIINMWQR
 IGQAMYAPPIQGVIRCVSNITGLILTRDGGSTNSTTETFRPGGG
 DMRDNWRSELYKYKVVCIG]ASGDIKLLNEQVNKEMQSSNL
 YMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIIFLNENN
 VPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISESINNIVDHAIK
 SKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNENHGLYL
 ADQYVKGIAKSRKS (SEQ ID NO:34)

с. Наночастицы LS и E2p, презентующие тример gp120

BG505 gp120Sht-LS
 (SEQ ID NO:35)

[GVWKDAETTLFCASDAKAYDTEKHNWATHACVPTDPNPQ
 EIHLENVTEEFNMWKNNMVEQMHTDIISLWDQSLKPCVKLT
 PLCVTLQCTNVTNNITDDMRGELKNCSFNMTTEL RDKKQKVY
 SLFYRLDVVQINENQGNRSNNSNKEYRLINCNTSAITQACPKV
 SFEPPIHYCAPAGFAILKCKDKKFNGTGPCPSVSTVQCTHGIK
 PVVSTQLLLNGSLAEEVMIRSENITNNAKNILVQFNTVPVQINC
 TRPNNNTRKSIRIGPGQAFYATGDIIGDIRQAHCNVSKATWNE
 TLGKVVKQLRKHFNGNNTIIRFANSSGGDLEVTTTHSFNCGGEFF
 YCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSITLPCRICKIINMWQ
 RIGQAMYAPPIQGVIRCVSNITGLILTRDGGSTNSTTETFRPGG
 GDMRDNWRSELYKYKVVKIEG]ASGMQIYEGKLTAEGLRFGI
 VASRFNHALVDRLVEGAIDCIVRHGGREEDITLVRVPGSWEIP
 VAAGELARKEDIDAVIAIGVLIRGATPHFDYIASEVSKGLANL
ALELRKPITFGVITADTLEQAIERAGTKHGNKGWEAALSAIEM
 ANLFKSLR

BG505 gp120Sht-E2p
 (SEQ ID NO:36)

[GVWKDAETTLFCASDAKAYDTEKHNWATHACVPTDPNPQ
 EIHLENVTEEFNMWKNNMVEQMHTDIISLWDQSLKPCVKLT
 PLCVTLQCTNVTNNITDDMRGELKNCSFNMTTEL RDKKQKVY
 SLFYRLDVVQINENQGNRSNNSNKEYRLINCNTSAITQACPKV
 SFEPPIHYCAPAGFAILKCKDKKFNGTGPCPSVSTVQCTHGIK
 PVVSTQLLLNGSLAEEVMIRSENITNNAKNILVQFNTVPVQINC
 TRPNNNTRKSIRIGPGQAFYATGDIIGDIRQAHCNVSKATWNE
 TLGKVVKQLRKHFNGNNTIIRFANSSGGDLEVTTTHSFNCGGEFF
 YCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSITLPCRICKIINMWQ
 RIGQAMYAPPIQGVIRCVSNITGLILTRDGGSTNSTTETFRPGG
 GDMRDNWRSELYKYKVVKIEG]ASGAAAKPATTEGEFPETRE
 KMSGIRRAIAKAMVHSKHTAPHVTLMDEADVTKLVAHRKKF

KAIAAEKGIKLTFLPYVVKALVSALREYPVLNTAIDDETEEIIQ
 KHYYNIGIAADTDGRGLLVPVIKHADRKPIFALAQEINELAEKA
 RDGKLTGEMKGASCTITNIGSAGGQWFTPVINHPEVAILGIG
 RIAEKPIVRDGEIVAAPMLALSLSFDHRMIDGATAQKALNHIK
 RLLSDPELLLM

d. Наночастицы ферритина, презентующие тример gp140^b

BG505 gp140.664-FR (SEQ ID NO:37) [AENLWVTVYYYGVPVWKDAETTLFCASDAKAYETEKHNW
 ATHACVPTDPNPQEIHLNVTEEFNMWKNNMVEQMHTDIISL
 WDQSLKPCVKLTPLCVTLQCTNVNITDDMRGELKNCSFN
 MTTEL RDKKQKVYSLFYRLDVVQINENQGNRSNNSNKEYRLI
 NCNTSAITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCKDKKFNGTGP
 CPSVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAEEVMIRSENITNNA
 KNILVQFNTPVQINCTRPNNNTRKSIRIGPGQAFYATGDIIGDIR
 QAHCNVSKATWNETLGKVVKQLRKHFGNNTIIRFANSSGGDL
 EVTTHSFNCGGEFFYCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSI
 TLPCR KQIINMWQRIGQAMYAPPIQGVIRCVSNITGLILTRDG
 GSTNSTTETFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTR
 CKRRVVGRRRRRRR~~AVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAASMTLT~~
 VQARNLLSGNPDWLPDMTVWGIKQLQARVLAVERYLRDQQL
 LGIWGCSGKLICCTNVPWNSSWSNRNLSEIWDNMTWLQWDK
 EISNYTQIIYGLLEESQNQQEKNEQDLLALD]ASGDIKLLNEQV
 NKEMQSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAK
 KLIIFLNENNPVQVLTSSAPEHKFEGLTQIFQKAYEHEQHISES
 INNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELI
 GNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS

BG505 gp140.664-10aa-FR (SEQ ID NO:38) [AENLWVTVYYYGVPVWKDAETTLFCASDAKAYETEKHNW
 ATHACVPTDPNPQEIHLNVTEEFNMWKNNMVEQMHTDIISL
 WDQSLKPCVKLTPLCVTLQCTNVNITDDMRGELKNCSFN
 MTTEL RDKKQKVYSLFYRLDVVQINENQGNRSNNSNKEYRLI
 NCNTSAITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCKDKKFNGTGP
 CPSVSTVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAEEVMIRSENITNNA
 KNILVQFNTPVQINCTRPNNNTRKSIRIGPGQAFYATGDIIGDIR
 QAHCNVSKATWNETLGKVVKQLRKHFGNNTIIRFANSSGGDL
 EVTTHSFNCGGEFFYCNTSGLFNSTWISNTSVQGSNSTGSNDSI
 TLPCR KQIINMWQRIGQAMYAPPIQGVIRCVSNITGLILTRDG
 GSTNSTTETFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTR
 CKRRVVGRRRRRRR~~AVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAASMTLT~~
 VQARNLLSGNPDWLPDMTVWGIKQLQARVLAVERYLRDQQL
 LGIWGCSGKLICCTNVPWNSSWSNRNLSEIWDNMTWLQWDK
 EISNYTQIIYGLLEESQNQQEKNEQDLLALD]GSGSGSGSGSASG
 DIKLLNEQVNKEMQSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDH
 AAEEYEHAKKLIIFLNENNPVQVLTSSAPEHKFEGLTQIFQKA
 YEHEQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVL
 FKDILDKIELIGNENHGLYLADQYVKGIAKSRKS

BG505 gp140.681-10aa-FR (SEQ ID NO:39) [AENLWVTVYYYGVPVWKDAETTLFCASDAKAYETEKHNW
 ATHACVPTDPNPQEIHLNVTEEFNMWKNNMVEQMHTDIISL

CKRRVVG**RRRRRR**AVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAASMTLT
VQARNLLSG**NPDWLPDM**TVWGIKQLQARVLAVERYLRDQQL
LGIWGCSGKLC**CT**NVPWNSSWSNRNLSEIWDNMTWLQWDK
EISNYTQIIYGLLEESQNQQEKNEQDLLALD]ASGAAAKPATTE
GEFPETREKMSGIRRAIAKAMVHSHKHTAPHVTLMDVTKL
VAHRKKFKAIAAEKGIKLTFLPYVVKALVSALREYPVLNT**A**ID
DETEEIIQKHYYNIGIAADTDRGLLVPVIKHADRKPIFALAEI
NELAEKARDGKLTPGEMKGASCTITNIGSAGGQWFTPVINHP
EVALGIGRIAEPKIVRDGEIVAAPMLALSLSFDHRMIDGATAQ
KALNHIKRLLSDPPELLLM

^a Для каждой конструкции антиген ВИЧ-1 представлен в квадратных скобках; мутации показаны подчеркнутым шрифтом. Мутации в последовательности наночастицы, целью которых было удаление N-связанных сайтов гликозилирования, показаны шрифтом с двойным подчеркиванием. Ферментативный сайт (ASG) между антигеном ВИЧ-1 и субъединицей частицы показан курсивом.

^b Последовательности gp140 содержат участок сконструированного посредством редизайна гептадного повтора 1 (HR1), который, как было обнаружено, в значительной степени улучшает выход и чистоту тримера с сохранением SOSIP-подобной структуры и антигенности. Модифицированный участок HR1 показан курсивом/шрифтом с двойным подчеркиванием, и линкер GS длиной 10 остатков (SEQ ID NO:42) показан курсивом/подчеркнутым шрифтом. Лидерную последовательность «MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSQEIHFRRGAR» (SEQ ID NO: 43) применяли для всех конструкций наночастицы gp140.

Пример 14 Некоторые иллюстративные способы для наночастиц, презентующих тример ВИЧ-1

[00129] Дизайн и моделирование наночастицы. Разрабатывали Perl-скрипт для

- 5 (1) поиска трехмерных вершин на поверхности данной наночастицы или ВПЧ, (2) наложения С-конца тримерного антигена ВИЧ-1 на N-концы трех субъединиц частицы вокруг каждой оси симметрии третьего порядка на поверхности частицы и (3) получения координат XYZ презентующей тример частицы с диаметром и другими структурными параметрами, рассчитанными по окончании процесса.
- 10 Полученную модель частицы визуализировали с применением программного обеспечения UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) для изучения вручную и выбора надлежащих линкеров.

- [00130]** Антитела для антигенного профилирования. Авторы настоящего изобретения применяли панель шНАТ и антител, отличных от НАТ, для
- 15 характеристики антигенности сконструированных тримеров. шНАТ 2G12 и b12, а также МАТ F240, 7B2, 17b и A32 заказывали в рамках программы поставки реактивов для исследований СПИДа Национальных институтов здоровья США (<https://www.aidsreagent.org/>). Другие шНАТ и антитела, отличные от НАТ, получали из других источников.

[00131] Экспрессия и очистка антигенов Env ВИЧ-1 и наночастиц. Тримеры и презентующие тример наночастицы временно экспрессировали в клетках HEK293 F (Life Technologies, Калифорния); мономерные наночастицы V1V2 и V1V2 временно экспрессировали в клетках HEK293 S. Вкратце, клетки HEK293 F/S оттаивали и инкубировали со средой для экспрессии FreeStyle™ 293 (Life Technologies, Калифорния) в шейкере-инкубаторе при температуре 37°C при 120 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). В случае наночастиц gp140 800 мкг плазмиды слитого белка и 300 мкг плазмиды фурина 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; тогда как в случае V1V2 и наночастиц gp120 использовали 900 мкг плазмиды химерного Env без фурина. После инкубации в течение 30 мин. к 1 л клеток 293F/S добавляли комплекс ДНК-PEI-MAX. Супернатанты культуры собирали через пять дней после трансфекции, осветляли центрифугированием при 1800 об./мин. в течение 22 мин. и фильтровали с применением фильтров с размером пор 0,45 мкм (Thermo Scientific). Белки экстрагировали из супернатанта с применением колонки с лектином *Galanthus nivalis* (GNL) (Vector Labs). Связанные белки элюировали ФБР, содержащим 500 мМ NaCl и 1 М метил- α -D-маннопиранозид, и очищали методом эксклюзионной хроматографии (ЭХ) на колонке Superdex 200 Increase 10/300 GL или колонке Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare). Концентрации белка определяли с применением УФ₂₈₀-поглощения с теоретическими коэффициентами экстинкции. В случае наночастиц gp140-ферритина для улучшения чистоты частицы применяли колонку Capto 700 Core (GE Healthcare) и аффинную колонку⁶ 2G12.

[00132] Голубой нативный (ГН) ПААГ. Наночастицы, презентующие тример ВИЧ-1, анализировали методом голубого нативного электрофореза в полиакриламидном геле (ГН-ПААГ) и окрашивали с применением Кумасси голубого. Образцы белка смешивали с красителем для нанесения и наносили на 4 – 12% гель Bis-Tris NuPAGE (Life Technologies). Гели ГН-ПААГ анализировали в течение 2 часов при напряжении 150 В с применением буфера для анализа NativePAGE™ (Life Technologies) согласно инструкциям производителя.

[00133] Подготовка образцов для электронной микроскопии и обработка данных. Очищенные наночастицы анализировали методом ЭМ с негативным

окрашиванием. Аликвоту объемом 3 мкл, содержащую ~0,01 мг/мл образца, в течение 15 с наносили на покрытую углеродом ячеистую сетку 400 Cu, на которую подавали тлеющий разряд при 20 мА в течение 30 с, а затем негативно окрашивали 2% муравьинокислым уранилом в течение 45 с. Данные собирали с применением электронного микроскопа FEI Tecnai Spirit, работающего при 120 кВ, при дозе электронов $\sim 30 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ и 52000-кратном увеличении, что обеспечило размер пикселя $2,05 \text{ \AA}$ на плоскости образца. Изображения получали с помощью фотокамеры Tietz 4k $\times$ 4k TemCam-F416 CMOS с применением номинальной дефокусировки 1000 нм и пакета программ Legion. Наночастицы отбирали автоматически с помощью программного обеспечения DoG Picker и помещали в стек частиц с применением пакета программного обеспечения Arpion. Бессмысленные двумерные (2D) средние значения класса рассчитывали с применением частиц, сгруппированных посредством итерационного MCA/MCB для кластеризации и 2D-выравнивания и систем программного обеспечения IMAGIC и сортировали на классы.

[00134] Анализ связывания методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). 96-луночные аналитические планшеты CostarTM (Corning) сенсibilizировали антигенами V1V2 в течение ночи при температуре 4°C. Лунки промывали однократно ФБР + 0,05 % Tween 20, а затем инкубировали с 150 мкл блокирующего буфера (ФБР с 5% масса/об. сухого молока) на лунку в течение 1 часа при комнатной температуре (к.т.) с последующей 5-кратной промывкой в ФБР + 0,05% Tween 20. Добавляли 50 мкл направленных на вершину шНАТ в блокирующем буфере с максимальной концентрацией 2 мкг/мл и 5-кратными серийными разведениями и инкубировали в течение 1 часа при к.т. После 5-кратной промывки в ФБР + 0,05% Tween 20 лунки инкубировали с 50 мкл антитела козы против IgG человека Peroxidase-AffiniPure (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) в соотношении 1:5000 в ФБР + 0,05% Tween 20 на лунку в течение 1 ч при к.т. После 5-кратной промывки в ФБР + 0,05% Tween 20 лунки анализировали с применением ТМВ (тетраметилбензидина) при к.т. в течение 5 мин., и реакцию останавливали 2 н серной кислотой. Считывание данных проводили при длине волны 450 нм.

[00135] Анализ связывания методом биослойной световой интерферометрии. Кинетику связывания антигена ВИЧ-1 и наночастицы с шНАТ и антителами, отличными от НАТ, 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/лунку. Анализы проводили при температуре 30°C в твердых черных 96-луночных планшетах (Geiger Bio-One). Для нанесения антитела на поверхность захватывающих биосенсоров против Fc человека (АНС) использовали 5 мкг/мл белка в однократном кинетическом буфере в течение 300 с. Перед анализом ассоциации антитела на биосенсоре с тримером Env в растворе в течение 200 с проводили этап получения базовой линии биосенсора в течение 60 с. В шести сериях титрования использовали двукратный градиент концентрации тримера, начиная с 200 нМ. 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 тримером, или сенсора без антитела, но инкубированного с тримером. Данные, полученные на приборе Octet, обрабатывали с применением программного обеспечения для получения данных fortéBio v.8.1. Экспериментальные данные аппроксимировали в отношении направленных на вершину V1V2 шНАТ с применением глобальной модели подгонки 1:1 для определения значения K_D и других кинетических параметров.

Пример 15 Дополнительная модификация домена gp41 для улучшения свойств тримера

[00136] Авторы настоящего изобретения предположили, что, помимо N-концевого изгиба гептадного участка 1 (HR1), который является первичной причиной метастабильности, другие участки в пределах gp41 также вносят вклад в метастабильность Env ВИЧ-1. Данную главную гипотезу можно реализовать в двух различных воплощениях.

[00137] В первом воплощении авторы настоящего изобретения предположили, что домен BG505 gp41, содержащий N-концевой изгиб сконструированного посредством редизайна HR1 и линкер сайта расщепления, можно применять для замены домена gp41 различных штаммов или подтипов ВИЧ-1 для получения «химерных» тримеров gp140 (называемых «UFO-BG») с такими же высокими выходом, чистотой и стабильностью, что и в случае тримера BG505 UFO gp140. Поскольку домен gp120 кодирует большинство эпитопов Env и, таким образом, определяет идентичность штамма или подтипа ВИЧ-1, такой «химерный» тример gp140 будет аналогичным с точки зрения антигенности тримеру gp140 дикого типа

(ДТ), но со значительно улучшенными выходом, чистотой и стабильностью. Для подтверждения данной гипотезы авторы настоящего изобретения выбрали 10 штаммов ВИЧ-1 5 различных клад (А, В, С, В'/С и А/Е), охватывающих большинство циркулирующих изолятов ВИЧ-1 в различных географических областях по всему миру. Данные 10 штаммов ВИЧ-1 включали BG505 (клада А, ранг 2), Q842-d12 (клада А, ранг 2), 6240.08.TA5.4622 (клада В, ранг 2), H078.14 (клада В, ранг 3), Du172.17 (клада С, ранг 2), 16055-2.3 (клада С, ранг 2), CN54 (клада В'/С, ранг неизвестен), CH115.12 (клада В'/С, ранг 3), 95TNIH022 (клада А/Е, ранг неизвестен) и 93JP_NH1 (клада А/Е, ранг неизвестен). В действительности, профили, полученные методом эксклюзионной хроматографии (ЭХ) на колонке Superdex 200 16/600 Hi-Load, продемонстрировали исключительную чистоту тримеров UFO-BG, полученных из различных штаммов ВИЧ-1. С применением биослойной интерферометрии (БСИ) авторы настоящего изобретения также измеряли антигенные профили для данных 10 тримеров UFO-BG в отношении панели 11 нейтрализующих антител широкого спектра действия (шНАТ) и 8 антител, отличных от НАТ, которые продемонстрировали характер, в целом, аналогичный тримерам gp140 дикого типа (ДТ) без замены домена gp41. Анализ 10 тримеров UFO-BG методом ЭМ с негативным окрашиванием свидетельствовал, что 80 – 100% полученного белка Env соответствует подобным нативным тримерам gp140. Наконец, была определена кристаллическая структура тримера UFO-BG gp140 клад В, штамма ранга 3, H078.14, которая подтвердила структурную целостность таких химерных вариантов дизайна gp140.

[00138] Во втором воплощении авторы настоящего изобретения предположили, что «универсальный» (или «консенсусный») домен gp41, полученный из базы данных последовательностей ВИЧ-1, содержащий N-концевой изгиб сконструированного посредством редизайна HR1 и линкер сайта расщепления, можно применять для замены домена gp41 различных штаммов или подтипов ВИЧ-1 для получения «химерных» тримеров gp140 (называемых «UFO-U») с улучшенными выходом, чистотой и антигенностью. Такой универсальный (или консенсусный) gp41 можно рассчитать из базы данных всех последовательностей ВИЧ-1 (UFO-UALL) или из базы данных последовательностей ВИЧ-1, принадлежащих к конкретному подтипу ВИЧ-1 (например, UFO-UA, -UB, -UC, -UBC и -UAE). Данные базы данных и их использование для получения «консенсусных» последовательностей хорошо известны в данной области техники.

См., например, публикации Kothe et al., Virol. 352:438-449, 2006; и Korber et al., Brit. Med. Bullet. 58:19-42, 2001. Для демонстрации эффективности данной стратегии дизайна авторы настоящего изобретения выбрали 5 репрезентативных штаммов ВИЧ-1, все из различных клад, для определения характеристик тримеров UFO-UALL. Аналогично тримерам UFO-BG, в случае тримеров UFO-UALL авторы настоящего изобретения наблюдали улучшенные профили ЭХ и профили связывания с антителом БСИ по сравнению с тримерами gp140 дикого типа (ДТ) без замены домена gp41. Анализ выбранных тримеров UFO-UALL методом ЭМ с негативным окрашиванием свидетельствовал, что 90 – 100% полученного белка Env соответствует подобным нативным тримерам gp140.

Пример 16 Экспонирование тримеров UFO gp140 на вирусоподобной частице бактериофага Q_β

[00139] Бактериофаг Q_β представляет собой икосаэдрический вирус диаметром 25 нм, способный инфицировать *Escherichia coli* (E. coli). Вирусоподобную частицу (ВПЧ), полученную из Q_β, применяли в качестве мультивалентного носителя для экспонирования чужеродных антигенов при разработке вакцины против гриппа (фаза I), аллергического ринита и астмы (фаза II, NCT00890734), злокачественной меланомы (фаза II, NCT00651703), болезни Альцгеймера (фаза II, NCT01097096), гипертензии (NCT00500786), никотиновой зависимости (фаза II, NCT01280968) и сахарного диабета II типа (фаза I, NCT00924105). Клинические исследования продемонстрировали безопасность и иммуногенность ВПЧ Q_β у людей. ВПЧ Q_β состоит из 180 идентичных субъединиц и, в принципе, может экспонировать 60 тримеров gp41 ВИЧ-1. Однако структурное моделирование свидетельствовало, что на поверхности ВПЧ может быть недостаточно места для размещения 60 тримеров gp140. Для снижения насыщенности поверхности авторы настоящего изобретения сконструировали ВПЧ Q_β посредством ковалентного присоединения двух субъединиц Q_β коротким глицин-сериновым (GS) линкером. Авторы настоящего изобретения также удалили обращенный вовнутрь сайт гликозилирования, который может оказывать влияние на сборку ВПЧ Q_β в клетках млекопитающих. Затем в качестве «перешейка» для соединения UFO gp140 и сконструированной субъединицы Q_β включали тримерный фолдон из фибритина головки фага T4 (идентификаторы PDB: 4NCV, 4NCW, 4NCU, 1RFO). Полученная

в результате конструкция при экспрессии в клетках млекопитающих собиралась в стабильную ВПЧ, экспонирующую на каждой частице 30 тримеров UFO gp140.

5 [00140] Таким образом, настоящее изобретение было раскрыто в общих чертах и проиллюстрировано со ссылкой на типичные варианты реализации, описанные выше. Следует понимать, что в настоящее изобретение могут быть введены различные модификации в рамках духа и объема настоящего изобретения

10 [00141] Также следует отметить, что все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в настоящем документе, однозначно и полностью включены посредством ссылки для всех целей в той же степени, как если бы каждая публикация была в отдельности включена посредством ссылки. Определения, содержащиеся в тексте, включенном посредством ссылки, исключены в том случае, если они противоречат определениям, приведенным в настоящем описании изобретения.

15

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полинуклеотид, кодирующий мономер модифицированного тримерного белка gp140 оболочки ВИЧ-1, содержащий полипептид gp120 и полипептид gp41,
5 причем остатки аминокислот 548-568 N-конца гептадного участка 1 (heptad region 1, HR1) полипептида gp41 заменены последовательностью петли длиной от 6 до 14 остатков аминокислот, которая стабилизирует структуру gp140 в состоянии до слияния, при этом нумерация остатков аминокислот соответствует номенклатуре HxB2.
- 10 2. Полинуклеотид по п. 1, отличающийся тем, что указанный полипептид gp41 представляет собой gp41_{ECTO}.
3. Полинуклеотид по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что указанные полипептиды gp120 и gp41 получены из различных штаммов ВИЧ-1.
4. Полинуклеотид по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что указанный
15 модифицированный белок gp140 оболочки ВИЧ-1 получен из штамма BG505 ВИЧ-1.
5. Полинуклеотид по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанная последовательность петли содержит (GS)₄ (SEQ ID NO:24).
6. Полинуклеотид по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанная
20 последовательность петли содержит 10 остатков аминокислот.
7. Полинуклеотид по п. 6, отличающийся тем, что указанная последовательность петли содержит любую из SEQ ID NO:1-5.
8. Полинуклеотид по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанная последовательность петли содержит 8 остатков аминокислот.
- 25 9. Полинуклеотид по п. 8, отличающийся тем, что указанная последовательность петли содержит любую из SEQ ID NO:6-10.
10. Полинуклеотид по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что указанный модифицированный белок gp140 оболочки ВИЧ-1 дополнительно содержит последовательность гибкого линкера, которая заменяет последовательность сайта
30 расщепления фурина между gp120 и gp41.
11. Полинуклеотид по п. 10, отличающийся тем, что указанная последовательность линкера содержит (G₄S)₂ (SEQ ID NO:22) или SGS и заменяет остатки 508 – 511 в сайте расщепления фурина.

12. Полинуклеотид по п. 10, отличающийся тем, что указанная последовательность линкера содержит 8 остатков аминокислот и заменяет остатки 501 – 518 в сайте расщепления фурина, и причем нумерация указанных остатков аминокислот соответствует таковой штамма ВИЧ-1 BG505. SOSIP.664 gp140.
- 5 13. Полинуклеотид по п. 12, отличающийся тем, что указанная последовательность линкера содержит последовательность, показанную согласно любой из SEQ ID NO:16-20.
14. Полинуклеотид по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что указанный модифицированный белок gp140 оболочки ВИЧ-1 дополнительно содержит
- 10 сконструированную дисульфидную связь между gp120 и gp41.
15. Полинуклеотид по п. 14, отличающийся тем, что указанная сконструированная дисульфидная связь находится между остатками A501C и T605C.
16. Полинуклеотид по п. 1, отличающийся тем, что полипептид gp41_{ECTO}
- 15 получен из штамма BG505 ВИЧ-1, и при этом N-конец гептадного участка 1 (HR1) (SEQ ID NO:28) в указанном полипептиде gp41_{ECTO} заменен последовательностью петли, представленной в SEQ ID NO:6.
17. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 1-16.
18. Клетка, несущая вектор по п. 17.
- 20 19. Полинуклеотид, кодирующий субъединицу самосборной композиции вакцины против ВИЧ-1, при этом указанная композиция вакцины против ВИЧ-1 содержит полученный из Env ВИЧ-1 тримерный иммуноген, представленный на самосборной наночастице или вирусоподобной частице (ВПЧ), при этом
- 25 указанный полученный из Env ВИЧ-1 тримерный иммуноген представляет собой модифицированный белок gp140, содержащий полипептид gp120 и полипептид gp41_{ECTO}, и причем остатки аминокислот 548-568 N-конца гептадного участка 1 (HR1) указанного полипептида gp41_{ECTO} заменены последовательностью петли размером от 6 до 14 остатков аминокислот, которая стабилизирует структуру gp140 в состоянии до слияния, при этом нумерация остатков аминокислот соответствует
- 30 номенклатуре HxB2.
20. Полинуклеотид по любому из пп. 1-4 или 19, отличающийся тем, что указанная последовательность петли содержит (a) (GS)_n (SEQ ID NO:23), причем n представляет собой любое целое число от 3 до 7 включительно, или (b)

последовательность, сконструированную посредством рациональной модификации с применением дизайна белков на основе ансамблей.

21. Полинуклеотид по п. 19 или 20, отличающийся тем, что указанная наночастица содержит дигидролипоил ацилтрансферазу (E2P), ферритин или люмазинсинтазу (LS).

22. Полинуклеотид по любому из пп. 19-21, отличающаяся тем, что указанный модифицированный белок gp140 ковалентным способом слит с субъединицей наночастицы.

23. Полинуклеотид по любому из пп. 19-22, отличающийся тем, что С-конец указанной последовательности модифицированного белка gp140 слит с N-концом указанной последовательности субъединицы наночастицы.

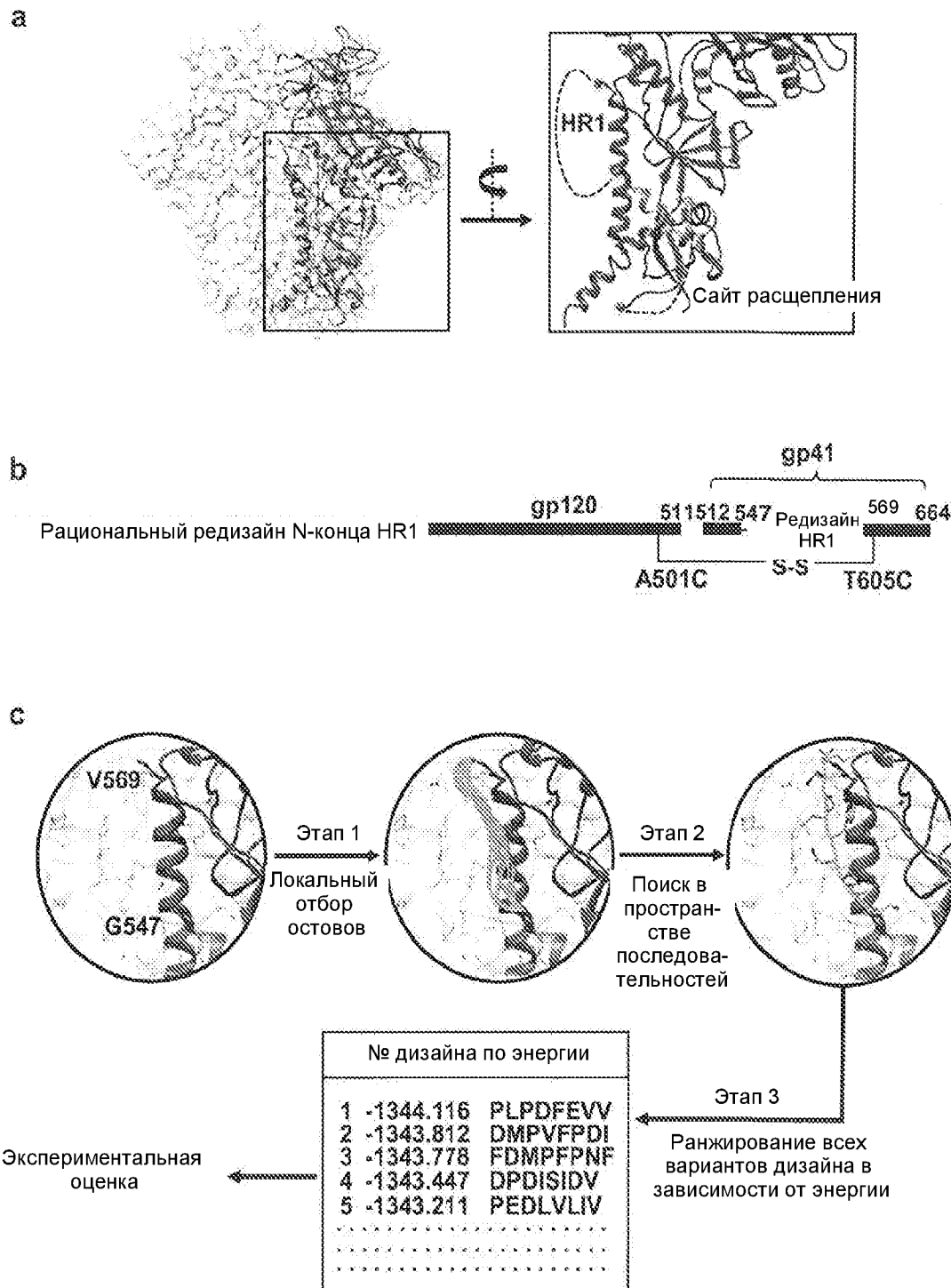
24. Полинуклеотид по п. 19, отличающийся тем, что указанный тример gp140 получен из штамма BG505 ВИЧ-1, и указанная последовательность петли имеет последовательность согласно SEQ ID NO:6.

25. Полинуклеотид по любому из пп. 1-11, 14-16 или 24, отличающийся тем, что указанный тример gp140 содержит (а) последовательность линкера $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO:22), которая заменяет остатки 508 – 511 в сайте расщепления фурина, и (b) сконструированную дисульфидную связь между остатками A501C и T605C.

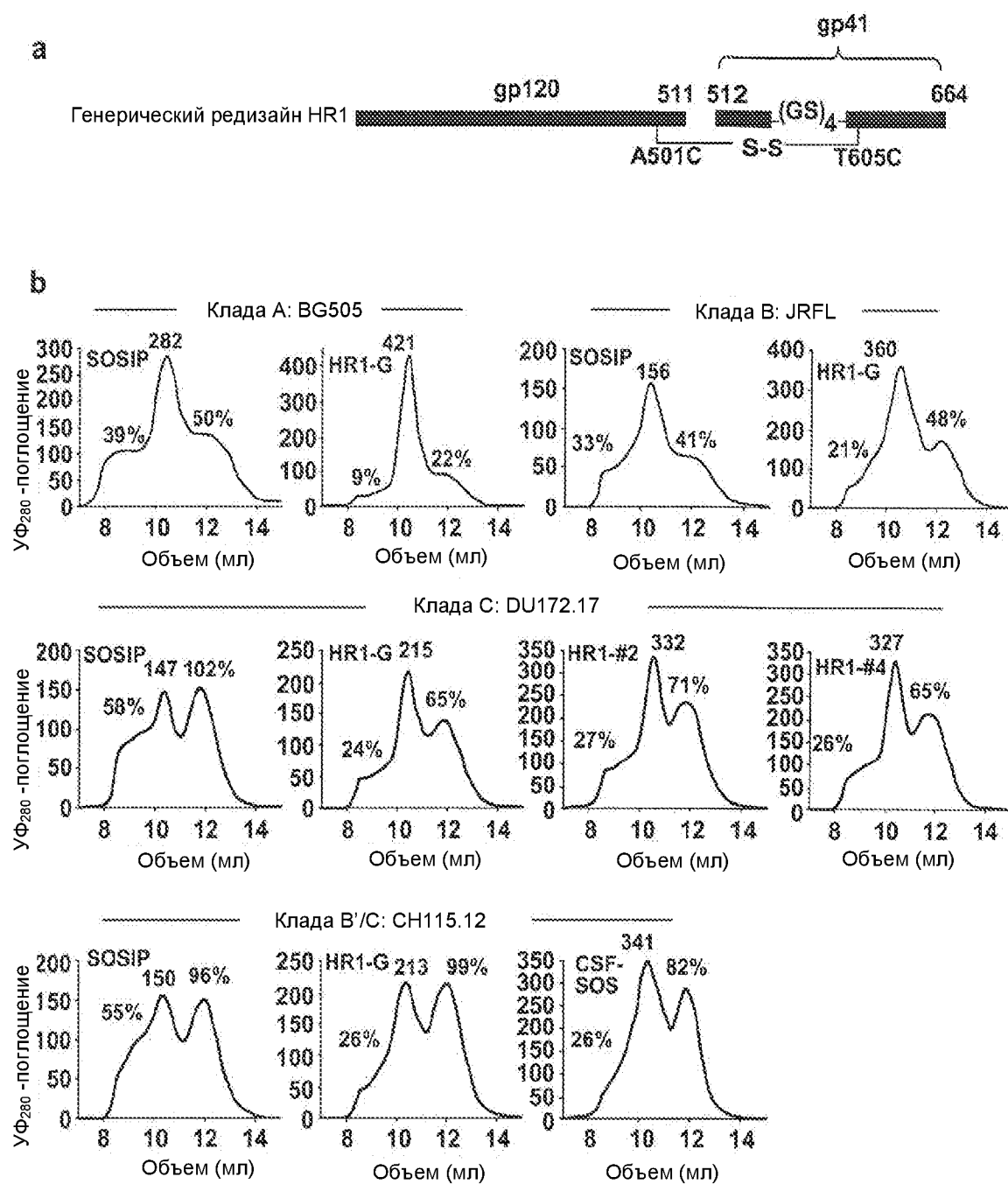
26. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 19-25.

27. Клетка, несущая вектор по п. 26.

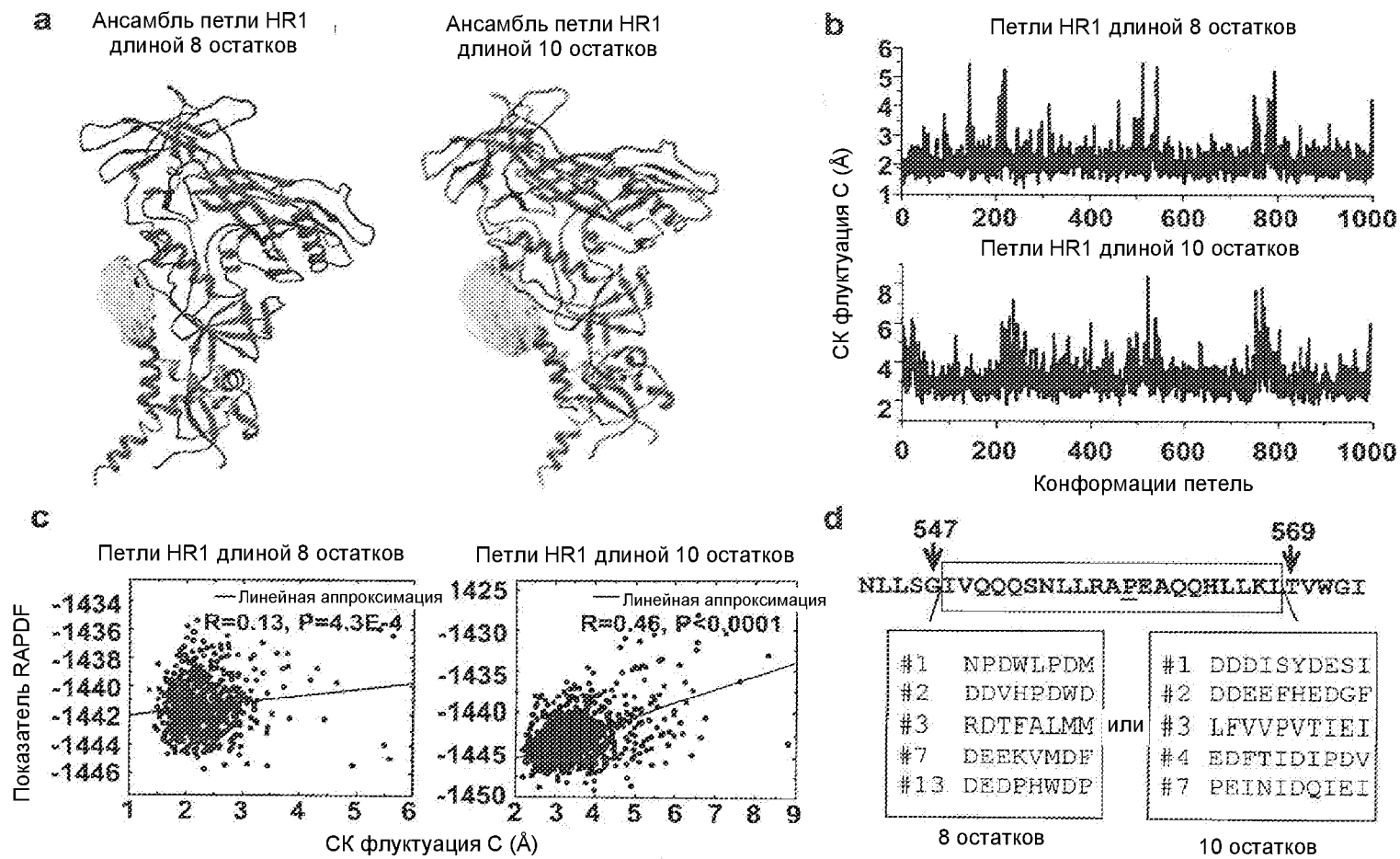
28. Способ лечения или предотвращения инфекции ВИЧ-1 у субъекта, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество полинуклеотида по п. 1 или п. 19, что обеспечивает лечение или предотвращение инфекции ВИЧ-1 у указанного субъекта.



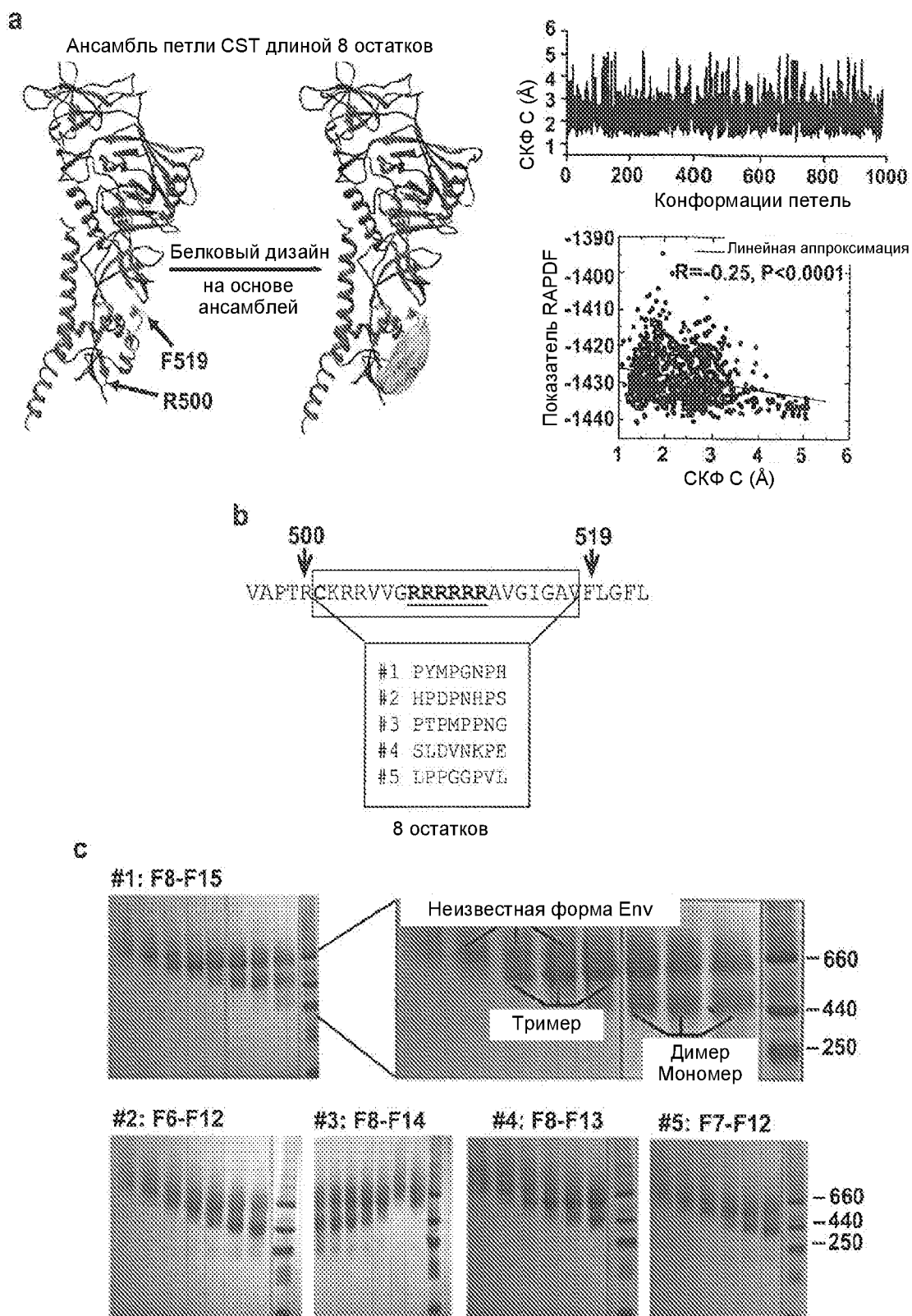
ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202292189

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C12N 15/49 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C12N 15/49, C12N 15/63, C12N 5/10, A61K 39/21, A61P 31/18

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
EAPATIS, Patentscope, Espacenet, PubMed, Google, Яндекс

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 2016037154 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES), 2016-03-10, формула изобретения, описание	1-28
A	US 2014212458 A1 (INTERNATIONAL AIDS VACCINE INITIATIVE; THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE; CORNELL CENTER FOR TECHNOLOGY ENTERPRISE AND COMMERCIALIZATION), 2014-07-31, формула изобретения, описание	1-28
A	EA 201591287 A1 (БЕТ ИЗРЕЙЭЛ ДИКОНИСС МЕДИКАЛ СЕНТЕР, ИНК.), 2015-12-30, формула изобретения, описание	1-28
A	WO 2008063331 A2 (PROGENICS PHARMACEUTICALS, INC.; CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.; DEY, ANTU, K.; MOORE, JOHN, P.; OLSON, WILLIAM, C.; IYER, SAI PRASAD, N.; KANG, KENNETH; FRANTI, MICHAEL), 2008-05-29, формула изобретения, описание	1-28
A	KESAVARDHANA S. et al. "Stabilizing the native trimer of HIV-1 Env by destabilizing the heterodimeric interface of the gp41 postfusion six-helix bundle", JOURNAL OF VIROLOGY, 2014, Vo.88, No.17, P.9590-9604, весь текст	1-28
A	GEORGIEV I. et al. Single-Chain Soluble BG505.SOSIP gp140 Trimers as Structural and Antigenic Mimics of Mature Closed HIV-1 Env. Journal of Virology, 2015, Vol. 89 No. 10, P. 5318-5329, весь текст	1-28

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

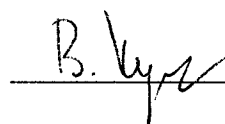
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **11/01/2023**

Уполномоченное лицо:

Заместитель начальника Управления экспертизы

Начальник отдела химии и медицины



А.В. Чебан