(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202390383 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.30

(22) Дата подачи заявки
2017.12.22

(51) Int. Cl. ***C07K 16/10*** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

(54) НЕЙТРАЛИЗИРУЮЩИЕ АНТИ-ВИЧ-1 АНТИТЕЛА ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/439,339; 62/444,946**
(32) **2016.12.27; 2017.01.11**
(33) **US**
(62) **201991591; 2017.12.22**

(71) Заявитель:
ДЗЕ РОКФЕЛЛЕР ЮНИВЕРСИТИ; КЭЛИФОРНИА ИНСТИТЬЮТ ОФ ТЕКНОЛОДЖИ (US)

(72) Изобретатель:
Нуссенцвейг Мишель, Фройнд Наталия Т., Бьеркман Памела Дж., Шарф Луиз (US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к нейтрализующим и эффективным анти-ВИЧ-1 антителам широкого спектра действия, наборам и способам их применения.

202390383 A1

202390383 A1

НЕЙТРАЛИЗИРУЮЩИЕ АНТИ-ВИЧ-1 АНТИТЕЛА ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

I. ЗАЯВЛЕНИЕ О ФЕДЕРАЛЬНОМ ФИНАНСИРОВАНИИ

Настоящее изобретение создано при государственной поддержке в рамках грантов P01 AI100148 и P50 GM082545-06, выделенных Национальным институтом здравоохранения (NIH). Государство США обладает определенными правами на настоящее изобретение.

II. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Областью изобретения является нейтрализующие анти-ВИЧ-1 антитела (bNab) широкого спектра действия и способы их применения.

III. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Вирус иммунодефицита человека («ВИЧ») – это лентивирус (семейство *Retroviridae*), который заражает людей. Если не лечить ВИЧ-инфекцию, то со временем она приведет к развитию синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД), состояния, при котором прогрессирующая недостаточность иммунной системы позволяет процветать опасным для жизни оппортунистическим инфекциям (например, токсоплазмоз) и раковым заболеваниям (например, саркома Капоши), что в конечном итоге приводит к смерти зараженного человека. Без лечения среднее время выживания после первичной инфекции составляет всего от 9 до 11 лет. ВИЧ/СПИД представляет собой серьезный глобальный кризис в области здравоохранения, который CDC считает пандемией: по состоянию на 2014 год около 37 миллионов человек инфицированы ВИЧ, в результате которого в том же году умерло около 1,2 миллиона человек.

ВИЧ имеет несколько подтипов, включая ВИЧ-1 и ВИЧ-2. ВИЧ-1 является более вирулентным, более инфекционным и преобладающей формой во всем мире, тогда как ВИЧ-2 является менее вирулентным, менее инфекционным и в настоящее время распространен только в Западной Африке. ВИЧ-1 является причиной большинства случаев ВИЧ-инфекций и, следовательно, представляет собой более клинически значимую мишень. ВИЧ-1 включает несколько подгрупп, в том числе группу M, группу N, группу O и группу P. Группа M, означающая «основная», включает примерно 90% случаев ВИЧ-инфекции и подразделяется еще на другие подтипы, A-K, которые иногда подразделяются еще на дополнительные подтипы (A1, A2 и т.д.). Исключительное разнообразие ВИЧ-1, вызванное высокой

частотой мутаций, затрудняет эффективное лечение ВИЧ. Для борьбы с этой проблемой исследователи пытались разработать так называемые нейтрализующие антитела («bNAb») широкого спектра действия, обозначенные таким образом, благодаря своей способности нейтрализовать несколько вирусных штаммов ВИЧ, например, несколько вирусных штаммов ВИЧ-1, например, раскрытых в US 2014/0328862, включенной в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки. У части людей, инфицированных ВИЧ-1, генерируются bNAb, которые обычно развиваются в течение 1-3 лет, в течение которых происходит коэволюция циркулирующих вирусных штаммов и антител. Однако эти bNab обычно не способны нейтрализовать сосуществующие аутологичные вирусы из-за опосредованного антителами отбора против чувствительных вирусных штаммов. Соответственно, существует острая необходимость в новых, нейтрализующих анти-ВИЧ антителах широкого спектра действия, которые проявляют высокий уровень активности против инфекции ВИЧ-1.

IV. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к ряду нейтрализующих эффективных анти-ВИЧ-1 антител широкого спектра действия и к способам их применения. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает анти-ВИЧ-1 антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело представляет собой нейтрализующее анти-ВИЧ-1 антитело (bNab) широкого спектра действия или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело включает NC37 и его антигенсвязывающие части. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело включает BG1 и его антигенсвязывающие части. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело включает BG18 и его антигенсвязывающие части. В некоторых вариантах осуществления изобретение включает вариант BG18 и его антигенсвязывающие части. В некоторых вариантах осуществления вариант BG18 включает одно из: 354BG8, 354BG18, 354BG42, 354BG33, 354BG129, 354BG188, 354BG411 и 354BG426 или их антигенсвязывающие части. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает моноклональное антитело (mAb). В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает рекомбинантное антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1-антитело или его

антигенсвязывающая часть включает рекомбинантно продуцируемое антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает биспецифическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающие части содержат вариабельную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит одну из SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81 и 89. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с одной из SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81 и 89. В некоторых вариантах осуществления одна или более из SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81 и 89 имеют консервативные замены.

В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающие части содержат вариабельную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи содержит одну из SEQ ID NO: 5, 13, 21, 29, 37, 45, 53, 61, 69, 77, 85 и 93. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с одной из SEQ ID NO: 5, 13, 21, 29, 37, 45, 53, 61, 69, 77, 85 и 93. В некоторых вариантах осуществления одна или более из SEQ ID NO: 5, 13, 21, 29, 37, 45, 53, 61, 69, 77, 85 и 93 имеют консервативные замены.

В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) в вариабельной области тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна CDR содержит одну из SEQ ID NO: 2-4, 10-12, 18-20, 26-28, 34-36, 42-44, 50-52, 58-60, 66-68. 74-76, 82-84 и 90-92. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одна CDR имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по

меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с одной из SEQ ID NO: 2-4, 10-12, 18-20, 26-28, 34-36, 42-44, 50-52, 58-60, 66-68, 74- 76, 82-84 и 90-92. В некоторых вариантах осуществления одна или более из SEQ ID NO: 2-4, 10-12, 18-20, 26-28, 34-36, 42-44, 50-52, 58-60, 66-68, 74- 76, 82-84 и 90-92 имеют консервативные замены.

В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть содержит, по меньшей мере, одну определяющую комплементарность область (CDR) в вариабельной области легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна CDR содержит одну из SEQ ID NO: 6-8, 14-16, 22-24, 30-32, 38-40, 46-48, 54-56, 62-64, 70-72, 78-80, 86-88 и 94-96. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна CDR имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с одной из SEQ ID NO: 6-8, 14-16, 22-24, 30-32, 38-40, 46-48, 54-56, 62-64, 70-72, 78-80, 86-88 и 94-96. В некоторых вариантах осуществления одна или более из SEQ ID NO: 6-8, 14-16, 22-24, 30-32, 38-40, 46-48, 54-56, 62-64, 70-72, 78- 80, 86-88 и 94-96 имеют консервативные замены.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к наборам, содержащим первое антитело. В некоторых вариантах осуществления первое антитело представляет собой анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает нейтрализующее анти-ВИЧ-1 антитело (bNab) широкого спектра действия. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее анти-ВИЧ-1 антитело широкого спектра действия представляет собой любое анти-ВИЧ-1 антитело по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело специфически связывается с ВИЧ-1 или его антигенным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело нейтрализует ВИЧ-1 при связывании. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат второе антитело. В некоторых вариантах осуществления второе антитело включает анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающую часть, которая специфически связывается с ВИЧ-1 или его антигенным фрагментом. В других вариантах осуществления второе антитело специфически

связывается с первым антителом или его антигенсвязывающей частью. В некоторых вариантах осуществления первое антитело или его антигенсвязывающая часть связана с субстратом. В некоторых вариантах осуществления второе антитело или его антигенсвязывающая часть связана с субстратом. В некоторых вариантах осуществления первое антитело или его антигенсвязывающая часть является детектируемо меченой. В некоторых вариантах осуществления второе антитело или его антигенсвязывающая часть является детектируемо меченой. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно из первого антитела или его антигенсвязывающей части и второго антитела или его антигенсвязывающей части является детектируемо меченым. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка содержит репортерную молекулу. В некоторых вариантах осуществления репортерная молекула содержит флуоресцентную молекулу. В некоторых вариантах осуществления репортер содержит радиоактивную метку. В других вариантах осуществления детектируемая метка содержит фермент. В некоторых вариантах осуществления наборы включают субстрат для фермента. В некоторых вариантах осуществления добавление субстрата к ферменту приводит к генерации детектируемого сигнала. В некоторых вариантах осуществления детектируемый сигнал включает окрашенный растворимый продукт. В некоторых вариантах осуществления радиоактивная метка включает I-125. В некоторых вариантах осуществления фермент включает пероксидазу хрена. В некоторых вариантах осуществления субстрат для фермента включает ТМВ. В некоторых вариантах осуществления наборы способны детектировать ВИЧ-1 или его антигенные фрагменты в образце. В некоторых вариантах осуществления наборы обеспечивают количественное определение ВИЧ-1 или его антигенных фрагментов, присутствующих в образце.

В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно содержат анти-ВИЧ агент. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ агент выбирают из группы, состоящей из ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (NNRTI), нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (NRTI), ингибиторов протеазы (PI), ингибиторов слияния, антагонистов CCR5/ингибиторов проникновения, ингибиторов переноса цепи интегразой (INSTI) и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ агент находится в стандартной лекарственной форме. В некоторых

вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть находятся в стандартной лекарственной форме. В некоторых вариантах осуществления стандартная лекарственная форма представляет собой инъецируемую стандартную лекарственную форму. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ агент находится в том же контейнере, что и анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ агент находится в отдельном контейнере. В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно содержат одно или более дополнительных анти-ВИЧ-1 антител или их антигенсвязывающих частей. В некоторых вариантах осуществления одно или более дополнительных анти-ВИЧ-1 антител или их антигенсвязывающих частей включают любые анти-ВИЧ-1 антитела по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления одно или более дополнительных анти-ВИЧ-1 антител или их антигенсвязывающих частей выбирают из группы, состоящей из NC37, NC133, NC102, AC40, AC41, AC72 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат инструкции по применению. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат один или более фармацевтически приемлемых носителей или консервантов.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу детектирования ВИЧ-1 или его антигенного фрагмента, присутствующего в образце. В некоторых вариантах осуществления способ включает получение образца, содержащего ВИЧ-1 или его антигенный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления способ включает контактирование образца с анти-ВИЧ-1 антителом или его антигенсвязывающей частью. В некоторых вариантах осуществления способ включает детектирование наличия специфического связывания анти-ВИЧ-1 антитела или его антигенсвязывающей части с ВИЧ или его антигенным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления способ включает количественное определение ВИЧ-1 или его антигенных фрагментов, присутствующих в образце. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой биологический образец. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть представляет собой анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающую часть в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает

моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает рекомбинантное антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть является рекомбинантно продуцируемой. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления детектирование наличия специфического связывания выполняют методом иммуноанализа. В некоторых вариантах осуществления детектирование наличия специфического связывания выполняют методом конкурентного иммуноанализа.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу диагностики индивидуума, как имеющего ВМЧ-1 инфекцию. В некоторых вариантах осуществления способ включает идентификацию индивидуума, имеющего или подозреваемого на наличие ВИЧ-1 инфекции. В некоторых вариантах осуществления способ содержит получение от индивидуума образца, содержащего ВИЧ-1 или его антигенного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления способ включает контактирование образца с анти-ВИЧ-1 антителом или его антигенсвязывающей частью. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть представляет собой анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающую часть в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления способ включает детектирование наличия специфического связывания анти-ВИЧ-1 антитела или его антигенсвязывающей части с ВИЧ или его антигенным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления способ включает диагностику индивидуума, как ВИЧ-1 инфицированного. В некоторых вариантах осуществления индивидуума диагностируют, как имеющего СПИД. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой биологический образец. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает рекомбинантное антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть является рекомбинантно продуцируемой. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления детектирование наличия

специфического связывания выполняют методом иммуноанализа. В некоторых вариантах осуществления детектирование наличия специфического связывания выполняют методом конкурентного иммуноанализа.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения ВИЧ-1 инфекции у нуждающегося в этом индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ лечения ВИЧ-1 инфекции включает введение индивидууму, имеющему или подозреваемому на наличие инфекции ВИЧ-1, по меньшей мере одного анти-ВИЧ-1 антитела или его антигенсвязывающей части. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть содержит нейтрализующее анти-ВИЧ-1 антитело широкого спектра действия (bNab) или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает любое анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающую часть в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления способ включает до стадии введения стадию идентификации индивидуума как ВИЧ-1 инфицированного. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело включает рекомбинантное антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть является рекомбинантно продуцируемой. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение по меньшей мере одного дополнительного анти-ВИЧ-1 антитела или его антигенсвязывающей части. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одно дополнительное анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает нейтрализующее анти-ВИЧ-1 антитело широкого спектра действия (bNab) или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает любое анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающую часть в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления

анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает рекомбинантное антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть является рекомбинантно продуцируемым. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение анти-ВИЧ агента. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ агента выбирают из группы, состоящей из ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (NNRTI), нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (NRTI), ингибиторов протеазы (PI), ингибиторов слияния, антагонистов CCR5/ингибиторов проникновения, ингибиторы переноса цепи интегразой (INSTI) и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть могут вводиться совместно с дополнительным анти-ВИЧ-1 антителом или антителами или их антигенсвязывающей частью(частями) и/или анти-ВИЧ агентом или анти-ВИЧ агентами. В других вариантах осуществления анти-ВИЧ антитело или его антигенсвязывающую часть вводят до введения дополнительного анти-ВИЧ-1 антитела или антител или их антигенсвязывающей части(частей) и/или анти-ВИЧ агента или анти-ВИЧ агентов. В других вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающую часть вводят после введения дополнительного анти-ВИЧ-1 антитела или антител или их антигенсвязывающей части(ей) и/или анти-ВИЧ агента или анти-ВИЧ агентов. В других вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающую часть можно вводить между дополнительными анти-ВИЧ-1 антителами или их антигенсвязывающей частью(частями) и/или анти-ВИЧ агентом или анти-ВИЧ агентами.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к пассивной вакцине. В некоторых вариантах осуществления вакцина содержит по меньшей мере одно анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает нейтрализующее анти-ВИЧ-1 антитело широкого спектра действия (bNab) или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает нейтрализующее анти-ВИЧ-1-антитело широкого спектра действия или его антигенсвязывающую часть в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает моноклональное антитело. В

некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть включает рекомбинантное антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающая часть является рекомбинантно продуцируемой. В некоторых вариантах осуществления пассивная вакцина дополнительно содержит адъювант. В некоторых вариантах осуществления пассивная вакцина дополнительно содержит фармацевтически приемлемый наполнитель, консервант и/или носитель. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу профилактики ВИЧ-1 инфекции у нуждающегося в этом индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму композиции пассивной вакцины в соответствии с любым аспектом настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или более тяжелых и/или легких цепей анти-ВИЧ-1 антитела по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или более из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 99, 73, 77, 81, 85, 89 и 93. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет консервативные замены. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или более CDR анти-ВИЧ-1 антител по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или более из SEQ ID NO: 2-4, 6-8, 10-12, 14-16, 18-20, 22-24, 26-28, 30-32, 34-36, 38-40, 42-44, 46-48, 50-52, 54-56, 58-60, 62-64, 66-68, 70-72, 74-76, 78-80, 82-84, 86-88, 90-92 и 94-96. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет консервативные замены.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к вектору или системе векторов, содержащих одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелые и/или легкие цепи и/или CDR одного или более анти-ВИЧ-1 антител или их антигенсвязывающие части по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления вектор или система векторов содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую

вариабельную область тяжелой цепи, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь, находится в том же векторе, что и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи, находится в другом векторе, отличном от вектора, в котором находится последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления вектор или система векторов представляет собой плазмиду или плазмиды. В некоторых вариантах осуществления вектор или система векторов представляет собой фаговый вектор или векторы. В некоторых вариантах осуществления фаговый вектор представляет собой γ-фаг. В некоторых вариантах осуществления вектор или векторы представляют собой космиду или космиды. В некоторых вариантах осуществления вектор или система векторов представляет собой рекомбинантную хромосому или рекомбинантные хромосомы. В некоторых вариантах осуществления система векторов представляет собой комбинацию разных векторов. В некоторых вариантах осуществления экспрессия различных последовательностей нуклеиновых кислот может осуществляться совместно. В других вариантах осуществления экспрессия различных последовательностей нуклеиновых кислот может индуцироваться независимо. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к вектору или системе векторов, содержащих одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих одну или более определяющих комплементарность областей (CDR) одной или более тяжелых и/или легких цепей одного или более анти-ВИЧ-1 антител по настоящему изобретению.

V. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг. 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F представлен репертуар анти-ВИЧ-1 антител, полученных от донора EB354. Фиг. 1A: Значения вирусной нагрузки, измеренные в 2002-2015 годах. На графике указаны моменты времени, когда были выделены нейтрализующие антитела. Момент времени сбора плазмы отмечен стрелками, направленными вниз. Фиг. 1B: Тепловая карта, показывающая значения IC_{50}, полученные в TZM-bl анализе, для очищенного сывороточного IgG в 4 временных точках (обозначенных стрелками на (1A)), протестированного относительно панели штаммов ВИЧ-1.

Все анализы нейтрализации выполняли в двух экземплярах. Фиг. 1C: Верхние панели: IgG+ B-клетки памяти, предварительно обогащенные CD19, окрашивали CD19 и тремя ненативными приманками ВИЧ-1: 2CC кор, складчатый тример $gp140_{YU2}$ и $gp140_{92UG37.8}$+$gp140_{CZA79012}$ (gp140 A+C) тримеры, и одна нативная приманка BG505.SOSIP-AviB. Популяции в квадратных вставках представляют собой клетки, полученные в результате сортировки единичных клеток, а числа указывают процент CD19+/затравка+ клеток относительно общего количества IgG+ клеток. Нижние панели: круговые диаграммы представляют общее количество последовательностей Ig, амплифицированных из клеток, полученных в результате сортировки единичных клеток, из соответствующего графика FACS, показанного сверху. Число в середине диаграмм указывает общее количество антител. Пустые срезы представляют собой последовательности, представленные в единичном экземпляре, не имеющие клонально родственных видов. Срезы представляют клоны антител и пропорциональны количеству последовательностей в каждом клоне. Клоны, отмеченные звездочкой, являются клонами, которые продемонстрировали нейтрализацию уровня (tier) 2, и представлены вариантами NC37, BG18 и BG1. Фиг. 1D: верхняя панель: тепловая карта, показывающая эффективность нейтрализации, основанная на на значениях IC_{50}, полученных в TZM-bl анализе, моноклональных антител NC37, BG1 и BG18. Нижняя панель: Эффективность нейтрализации, основанная на значениях IC_{50}, полученных в TZM-bl анализе, поликлонального IgG донора из образца 2014 года, а также NC37, BG1 и BG18 к $YU2_{WT}$, $YU2_{N280Y}$, $YU2N_{N332K}$ и $YU2N_{N160K}$. Все TZM-bl анализы выполняли в двух экземплярах. Фиг. 1E: Тепловая карта эффективности нейтрализации, на значениях IC_{50}, полученных в анализе TZM-bl, антител NC37, BG1, BG18 и 1:1:1 комбинации («комб.»), протестированных относительно панели из 120 псевдовирусов ВИЧ-1 уровня 2. Среднее геометрическое значение всех нейтрализованных вирусов и процент широты действия указаны на нижней панели. Анализы нейтрализации выполняли в двух экземплярах. Фиг. 1F: кривая покрытия, основанная на значениях из (1E).

На фиг. 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G представлены последовательность и структурный анализ bNab BG18. Фиг. 2A: выравнивание аминокислотных последовательностей тяжелых цепей 10-1074, PGT121 и BG18. Звездочки обозначают зазоры (гэпы), возникающие в процессе выравнивания. Стрелки указывают положения

в каркасе, в которых все три антитела мутированы относительно их соответствующих генов зародышевой линии. Указаны CDR H1, H2 и H3. ФИГ.2B: выравнивание последовательностей легких цепей, как и в (A) для 10-1074, PGT121 и BG18. Фиг. 2C: Левая панель: ленточная диаграмма доменов V_H (темно-серый) и V_L (светло-серый) Fab BG18, показанная с разрешением 1,3 Å. Средняя панель: Представление поверхности вариабельной области BG18. Правая панель: конформация CDRH3 стабилизируется водородными связями (показаны пунктирными линиями) внутри петли. Взаимодействующие остатки показаны в виде палочек, остаток CDRH3 и соседний CDRH1 показаны в виде ленточных диаграмм. Фиг. 2D: левая панель: ленточные диаграммы, показывающие наложение вариабельных доменов BG18 (фиолетовый), PGT121 (зеленый) и 10-1074 (синий). CDRH3 BG18 выделен красным, петли CDRH3 PGT121 и 10-1074 выделены темно-бордовым. Правая панель: V_L BG18 (светло-розовый) и PGT121 (светло-зеленый) показаны после наложения V_H. $CDRL2_{BG18}$ не имеет упорядоченной структуры в кристалле и обозначен пунктирной линией. 10-1074 тесно связан с PGT121 и не показан для ясности. Фиг. 2E: Представление поверхностей BG18 и PGT121. Фиг. 2F: ЭМ структура единичной частицы (прозрачная серая плотность) BG505 SOSIP.664, связанная с Fab BG18 и Fab 179NC75. Координаты для BG505 SOSIP.664, Fab BG18 и модель для Fab 179NC75 (Fab CH103: PDB 4JAM) вписывали в ЭМ плотность, как описано в Примере 1 ниже. Приведены средние значения 2D-классов. Фиг. 2G: сравнение угла связывания BG505, характерного для Fab BG18, относительно Fab 10-1074, PGT122 (PDB 5FYJ), PGT135 (PDB 4JM2) и PGT128 (PDB 5ACO). Плотности для Fabs 179NC75 вычитали из карты BG18-179NC75-BG505 для облегчения сравнений.

На фиг. 3A, 3B, 3C, 3D, 3E представлены аутологичные вирусы, присутствующие в плазме у донора EB354. Фиг.3A: Полученное методом максимального правдоподобия филогенетическое древо последовательностей генов env, полученных из одного генома из образцов донора EB354, взятых в 2006, 2010, 2013 и 2014 годах. Красная звездочка означает филогенетические ветви с бутстрэп-оценкой ≥90%. Три основные группы последовательностей произвольно названы кластерами A, B и C. Три треугольника указывают последовательности env, в которых отсутствует N-связанный сайт гликозилирования. Квадраты, выделенные пунктирными линиями, указывают VOC культуры; число в скобках представляет количество вирусных последовательностей env в VOC.

ФИГ. 3B. Диаграммы разброса данных, изображающие парное разнообразие нуклеотидных последовательностей для последовательностей *env* плазмы, полученной в 2010, 2013 и 2014 гг. Каждая точка представляет генетическое различие в попарном сравнении двух последовательностей в заданный момент времени. Значения P определяли с помощью Z-критерия, основанного на U-статистике для двух выборок, и указывают ***p<0,0005. Фиг. 3C: тепловые карты, показывающие значения IC_{50}, полученные в TZM-bl анализе, для BG18, BG1, NC37, а также IgG, очищенного в тот же момент времени, что и вирусные гены env, к аутологичным псевдовирусам, используя последовательности env донора EB354. Звезды обозначают псевдовирусы, которые устойчивы ко всем трем аутологичным bNAb. Антитело 3BNC117 (описанное в US 2014/0328862) служило контролем. Круги слева соответствуют моментам времени, в которые была получена последовательность, указанная в (3A). Анализы нейтрализации проводили в двух экземплярах и повторяли, по меньшей мере, дважды. Серые квадраты указывают на то, что анализ не был проведен. Фиг. 3D: круговые диаграммы представляют чувствительность аутологичных псевдовирусов, полученную с использованием последовательностей env донора EB354, к каждому из трех аутологичных bNAb в разные проанализированные моменты времени. Число в середине круга оюозначает количество протестированных env псевдовирусов, а различные срезы пропорциональны количеству псевдовирусов. bNAb указаны слева, а моменты времени, когда были получены образцы, указаны над графиками. Столбцы под кругами показывают, когда были обнаружены транскрипты антител с помощью ПЦР. Фиг. 3E: значения IC_{50}, полученные в TZM-bl анализе, для BG18, BG1, NC37 и контрольного bNAb 3BNC117 к VOC, полученным из CD35 T-клеток донора EB354 в 2014 и 2015 гг.

На фиг.4A, 4B, 4C, 4D, 4E показано лечение $ВИЧ_{YU2}$-инфицированных мышей. Фиг. 4A: значения вирусной нагрузки у четырех (BG18) и пяти (NC37) $ВИЧ_{YU2}$-инфицированных hu-мышей до и после монотерапии антителом BG18 (верхняя панель) или NC37 (нижняя панель). Заштрихованная серым цветом область на графике указывает период времени, в течение которого вводили BG18 (вверху) или NC37 (внизу). Жирные линии указывают средние геометрические значения в каждом эксперименте по лечению. Фиг. 4B: выравнивание аминокислотных последовательностей gp120 из вирусов, клонированных на 21 день после терапии BG18 (вверху)

или NC37 (внизу). Каждая горизонтальная полоса представляет собой последовательность одного клона gp120, выровненную относительно ВИЧ-1_{YU2}. Аминокислотные замены указаны в виде галочек. Идентификатор (ID) мыши, из которой была получена последовательность, указан на вертикальных столбцах. Увеличенный вид областей, показанный в отдельных квадратах, приведен справа на каждой панели. Фиг. 4C: круговые диаграммы, показывающие рекуррентные мутации для BG18 (вверху) и NC37 (внизу) в gp120 относительно последовательности HIV-1_{YU2} дикого типа. Различные срезы пропорциональны количеству последовательностей, которые несут мутации. Число в центре круга обозначает общее количество клонированных последовательностей. Белый срез в NC37 указывает на отсутствие каких-либо повторяющихся мутаций. Фиг. 4D: значения вирусной нагрузки у семи hu-мышей до и после лечения комбинацией BG18+NC37+BG1. Мыши T1 и T2 являются необработанными контрольными мышами (незакрашенные значки). Мыши T3-T7 получали комбинацию BG18+NC37+BG1 (закрашенные значки). Заштрихованная область указывает период времени, в течение которого вводили комбинацию bNAb. Средние геометрические значения показаны жирными линиями, пунктирная линия относится к необработанной группе, а сплошные линии - к обработанное группы. Фиг. 4E: разница Log10 в вирусной нагрузке по сравнению с днем 0 (до введения антител). Звездочкой обозначено выпадающее значение.

На фиг. 5A, 5B представлены результаты конкурентного ИФА. Каждое из нейтрализующих антител (равные количества) анализировали методом ИФА в отношении связывания с BG505 SOSIP.664 в присутствии возрастающих количеств различных конкурирующих антител. Черная линия указывает на связывание биотинилированного антитела в отсутствие конкуренции. Фиг. 5A: BG18, фиг. 5B: BG1.

На фиг. 6A, 6B, 6C, 6D представлено сравнение последовательностей между BG18, PGT121 и 10-1074. Фиг. 6A: Дендрограмма последовательностей тяжелых цепей PGT121, 10-1074 и девяти клональных вариантов BG18, а также их предсказанных зародышевых линий. Фиг. 6B: выравнивание CDR тяжелой цепи. Выделены позиции, общие для PGT121/10-1074 и вариантов BG18. Фиг. 6C: То же, что в (6A), но для легких цепей. Фиг. 6D: выравнивание CDR легкой цепи. Выделены позиции, общие для PGT121/10-1074 и вариантов BG18.

На Фиг. 7 показан электростатический потенциал BG18.

Электростатические поверхностные потенциалы Fab рассчитывали с помощью программы APBS, а представление поверхности получено с помощью UCSF Chimerac затенениями. Предсказанные интерфейсы связывания выделены пунктирной черной линией. Примерные области узнавания на поверхностях Fab PGT121 и 10-1074 гликанов gp120, прикрепленных к Asn137gp120, Asn156gp120 и Asn332gp120, обозначены черными треугольниками.

На фиг. 8A, 8B, 8C представлена структура комплекса NC37 Fab-gp120. Фиг. 8A: кристаллическая структура (с разрешением 2,7 Å) комплекса NC37 Fab-gp120, наложенная на структуру комплекса 8ab134 Fab-gp120 (PDB 4RX4), обнаруживает сходную ориентацию связывания gp120 у двух антител. Фиг. 8B: крупный план интерфейса Fab-gp120 показывает увеличенный CDRH3 NC37 по сравнению с 8ANC134 CDRH3. Фиг. 8C: вид сбоку структуры тримера BG505 в виде поверхности (PDB 4TVP) с предсказанными эпитопами для NC37, 8ANC134 и NIH45-46, показанными на одном протомере тримера. Более длинный CDRH3 NC37 предполагает большую площадь контакта на соседнем протомере (светло-серый) тримера.

На фиг. 9A, 9B, 9C, 9D, 9E, 9F представлено связывание антитела BG18 с синтетическими гликопептидами V3 ВИЧ-1. Биотин-меченные гликопептиды V3 иммобилизовали на чипе с нейтравидином, и в качестве аналита использовали IgG BG8. Фиг. 9A: Взаимодействие между BG18 и гликопептидом JR-FL mini-V3, несущим гликан Man9GlcNAc2 в N301. Наблюдается слабое связывание. Фиг. 9B. Взаимодействие между BG18 и гликопептидом JR-FL mini-V3, несущим гликан Man9GlcNAc2 в N332. Наблюдается слабое связывание. Фиг. 9C: Взаимодействие между BG18 IgG и гликопептидом JR-FL mini-V3, несущий 2-антенарный комплексный тип N-гликан в N301. Связывания не наблюдается. Фиг. 9D: Взаимодействие между BG18 IgG и гликопептидом JR-FL mini-V3, несущим 2-антенарный комплексный тип N-гликан в N332. Связывания не наблюдается. Фиг. 9E: взаимодействие между IgG BG18 и гликопептидом mini-V3 A244, несущим гликан Man9GlcNAc2 в N334. Наблюдается слабое связывание. Фиг. 9F: взаимодействие между BG18 IgG и гликопептидом CAP45 mini-V3, несущим гликан Man9GlcNAc2 в N334. Наблюдается слабое связывание.

На фиг. 10A, 10B, 10C представлено секвенирование единичного генома вируса, полученного из плазмы донора EB354. Фиг. 10A: круговые диаграммы обозначают общее количество последовательностей env, амплифицированных методом ПЦР из одного

генома, для каждого момента времени сбора образца. Общее количество последовательностей, полученных в каждой временной точке, приведены в центре круговой диаграммы, а различные срезы пропорциональны количеству последовательностей. Фиг. 10B: Полученное методом максимального правдоподобия филогенетическое дерево последовательностей генов env, выделенных из одного генома из образцов донора EB354, собранных в 2006, 2010, 2013 и 2014 годах. Звездочка означает филогенетические ветви с бутстрэп-оценкой ≥90%. В таблице справа показаны значения $TCID_{50}$ и IC_{50}, полученные в TZM-bl анализе, для BG18, BG1, NC37 и контрольного антитела 3BNC117 к аутологичным псевдовирусам с использованием последовательностей env донора EB354. Фиг. 10C: Сравнение значений $TCID_{50}$ для псевдовирусов с использованием env донора EB354, которые оказались устойчивыми ко всем трем bNAb, в отличие от псевдовирусов с использованием последовательностей env донора EB354, которые оказались чувствительными по меньшей мере к одному bNAb. P-значение (т-тест) = 0,0016.

На фиг. 11A, 11B, 11C показаны результаты лечения антителом BG8 ВИЧ$_{YU2}$-инфицированных hu-мышей. Фиг. 11A: значения вирусной нагрузки у четырех hu-мышей до и после введения BG8. Заштрихованная серым цветом область на графике указывает период времени, в течение которого вводили антитело. Жирные линии обозначают средние геометрические значения. Фиг. 11B: выравнивание аминокислотных последовательностей gp120 из вирусов, клонированных на 21 день после терапии. Каждая горизонтальная серая полоса представляет последовательность одного клона gp120, выровненного относительно ВИЧ-1$_{YU2}$. Аминокислотные замены обозначены черными галочками. Идентификатор (ID) мыши, из которой была получена последовательность, указан на вертикальных черных полосах. Увеличенный вид областей, показанных в отдельных квадратах, приведен справа на каждой панели. Фиг. 11C: круговые диаграммы, показывающие рецидивирующие мутации в gp120 относительно последовательности ВИЧ-1$_{YU2}$ дикого типа после терапии BG8. Число в центре круга обозначает общее количество клонированных последовательностей; срезы представляют наиболее стабильно мутированные области в gp120 и пропорциональны количеству последовательностей, которые несут мутации.

На фиг. 12A, 12B представлены вирусные нагрузки у ВИЧ$_{YU2}$-инфицированных, гуманизированных мышей, получавших антитела.

Значения вирусной нагрузки у ВИЧ$_{YU2}$-инфицированных гуманизированных мышей до и после монотерапии BG18 (фиг. 12A) и NC37 (фиг. 12B). Заштрихованная область на графике указывает период времени, в течение которого вводилось антитело. На каждом графике показаны результаты двух независимых экспериментов, обозначенных кружками (один эксперимент) и квадратами (второй эксперимент). Закрашенные и незакрашенные формы обозначают обработанных и контрольных мышей, соответственно. Пунктирные и сплошные жирные линии показывают средние значения для контрольных и обработанных мышей, соответственно.

VI. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

A. Определения

В данной области известно, что анти-ВИЧ-1 антитело может принимать одну из многочисленных форм, как описано в настоящей заявке. Антитела частично определяются антигенами, с которыми они связываются, таким образом, «анти-ВИЧ-1 антитело» представляет собой любое антитело, которое специфически связывается с по меньшей мере одним эпитопом, обнаруженным в вирусной оболочке вируса иммунодефицита человека 1 («ВИЧ-1»), например в gp120 и/или gp140, описанных в настоящей заявке. В данной области техники известно, что антитело представляет собой гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, или его антигенсвязывающую часть. Тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH1, CH2 и CH3). Легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Вариабельные области как тяжелой, так и легкой цепей включают каркасные области (FWR) и определяющие комплементарность области (CDR). Четыре области FWR являются относительно консервативными, в то время как области CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) представляют собой гипервариабельные области и расположены в направлении от NH_2-конца к COOH-концу следующим образом: FWR1, CDR1, FWR2, CDR2, FWR3, CDR3, FWR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном, в то время как константная область(области) в зависимости от изотипа может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина. В данной области техники известно, что можно манипулировать моноклональными и другими антителами и использовать методы

технологии рекомбинантных ДНК для получения других антител или химерных молекул, которые сохраняют специфичность исходного антитела. Такие способы могут включать введение ДНК, кодирующей вариабельную область иммуноглобулина, или CDR антитела в константные области или константные области плюс каркасные области другого иммуноглобулина.

Используемый в настоящем описании термин «антитело» (Ab) применяется в самом широком смысле и, в частности, может включать любой иммуноглобулин, будь то природный или частично или полностью синтезированный, включая, без ограничения, моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела и полиреактивные антитела) и фрагменты антител. Таким образом, термин «антитело», используемый в настоящем описании в любом контексте, включает, без ограничения, любой специфический связывающий элемент, класс и/или изотип иммуноглобулина (например, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE) и биологически релевантный фрагмент или его специфически связывающий элемент, включая, без ограничения, Fab, $F(ab')_2$, scFv (одноцепочечный или родственный объект) и $(scFv)_2$.

Используемый в настоящей заявке термин «фрагменты антитела» может включать фрагменты антитела, которые получены методами, хорошо известными и доступными специалистам в данной области, описанными в настоящей заявке. Следовательно, в дополнение к приведенному выше определению «антитела» термин «антитело» может дополнительно охватывать любой полипептид или белок, содержащий часть интактного антитела, такую как антигенсвязывающая или вариабельная область интактного антитела. Они могут быть получены из природных источников или могут быть синтезированы полностью или частично. Примеры фрагментов антител включают, без ограничения, фрагменты Fab, Fab', $F(ab')_2$ и Fv; диатела и линейные антитела. Используемые в настоящей заявке термины «антигенсвязывающая часть», «антигенсвязывающий фрагмент» или «Fab» могут относиться к области антитела, которая связывается с антигенами. Специалист в данной области поймет, что Fab состоит из одного константного и одного вариабельного домена каждой из тяжелой и легкой цепи антитела.

Используемый в настоящем описании термин «моноклональное антитело» или «mAb» может относиться к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные

антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела могут включать химерные антитела, гуманизированные антитела, рекомбинантные антитела и человеческие антитела. Способы получения моноклональных антител хорошо известны в данной области, включая некоторые конкретные примерами, обсуждаемыми ниже, в том числе технология гибридомы, получение рекомбинантных антител, например, с помощью технологии фагового дисплея или дрожжевого дисплея, продуцирование трансгенными мышами и культурами единичных В-клеток. Методы, которые включают амплификацию тяжелых и/или легких цепей генов антител (например, плазмиды или космиды) с помощью ПЦР (или аналогичным методом) либо *in vitro*, либо в бактериальных системах и/или системах млекопитающих и/или дрожжевых системах, входят в объем настоящего изобретения.

Используемые в настоящем описании термины «консервативные модификации последовательностей» или «консервативные замены» могут относиться к аминокислотным модификациям целевого эпитопа по изобретению, которые не оказывают существенного влияния или не изменяют характеристики связывания анти-ВИЧ-1 антител с эпитопом(ами). Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, добавления и делеции. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, при которых аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, определены в данной области. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или более аминокислотных остатков в целевом эпитопе, с которым специфически связываются анти-ВИЧ-1 антитела по изобретению, например эпитопы на оболочке вируса ВИЧ-1, например эпитопы на

gp120 и/или gp140, могут быть заменены другими аминокислотными остатками из того же семейства боковых цепей, и антитела по настоящему изобретению могут быть протестированы относительно целевого эпитопа, например, с использованием функциональных анализов, описанных в настоящей заявке или известных иным образом в данной области техники.

Термин «биологический образец» относится к образцу, полученному из организма (например, пациента) или из компонентов (например, клеток) организма. Образец может представлять собой любую биологическую ткань, клетку(и) или жидкость. Образец может представлять собой «клинический образец», который является образцом, полученным от субъекта, такого как пациент-человек. Такие образцы включают, без ограничения, слюну, мокроту, кровь, клетки крови (например, белые кровяные клетки), телесные жидкости, лаваж, соки поджелудочной железы, желудочный сок, выделения, ЦСЖ, лимфатическую амниотическую жидкость, плазму, сперму, костный мозг и образцы биопсии ткани или образцы пункционной биопсии, мочу, стул, перитонеальную жидкость и плевральную жидкость или их клетки и любые их комбинации. Биологические образцы также могут включать срезы тканей, такие как замороженные срезы, взятые для гистологических целей. Биологический образец также может упоминаться как «образец пациента». Биологический образец также может включать по существу очищенный или выделенный белок, мембранный препарат или клеточную культуру.

Термин «биспецифическое антитело» относится к искусственным конструкциям иммуноглобулина, состоящие из фрагментов двух разных моноклональных антител, которые связываются с двумя разными антигенами. Существует несколько различных типов биспецифических антител, включая, без ограничения, трифункциональные антитела и химически связанные Fab. Анти-ВИЧ-1 антитела по настоящему изобретению могут включать биспецифические антитела и фрагменты одного или более разных анти-ВИЧ-1 антител, включая одно или более разных анти-ВИЧ-1 антител по настоящему изобретению, например, BG18 и BG1 или одно или более анти-ВИЧ-1 антител по настоящему изобретению и известных анти-ВИЧ-1 антител, например, BG18 и 3BNC117 (описанного в US 2014/0328862) или BG18 и VRC01, описанного в US 8,637,036. Биспецифические bNab к ВИЧ и способы их получения и применения описаны в PCT/US16/64713, включенной в настоящее

описание в виде ссылки.

Используемые в настоящем описании термины «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» могут относиться к количеству соединения или агента, которое способно обеспечить нужный с медицинской точки зрения результат у субъекта, подвергаемого лечению. Способ лечения может быть выполнен *in vivo* или *ex vivo*, отдельно или в сочетании с другими лекарственными средствами или терапией. Терапевтически эффективное количество может быть введено за одно или более введений, применений или дозирований и не предназначено для ограничения конкретным препаратом или способом введения.

Термины «специфическое связывание», «селективное связывание», «селективно связывается» и «специфически связывается» могут относиться к связыванию антитела с эпитопом на предварительно определенном антигене, но не с другими антигенами. Как правило, антитело связывается с равновесной константой диссоциации (K_D), равной примерно менее 10^{-6} М, например, примерно менее 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже ниже, определенной, например, методом равновесного диализа или поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в приборе поверхностного плазмонного резонанса BIACORE® 2000 с использованием заранее заданного антигена, например эпитопа на оболочке вируса ВИЧ-1, например gp120, в качестве аналита, и антитела в качестве лиганда, или с помощью анализа Скэтчарда связывания антитела с антиген-положительными клетками, и (ii) связывается с предварительно определенным антигеном со сродством, которое по меньшей мере в два раза превышает его сродство связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от заранее заданного антигена или близкородственного антигена.

Используемый в настоящем описании термин «гомология» может относиться к существованию общей структуры между двумя композициями. Термин «гомология» в контексте белков может относиться к величине (например, выраженной в процентах) перекрытия между двумя или более аминокислотными и/или пептидными последовательностями. В контексте нуклеиновых кислот этот термин может относиться к величине (например, выраженной в процентах) перекрытия между двумя или более последовательностями нуклеиновых кислот. Используемый в настоящем описании процент (%) гомологии между двумя последовательностями эквивалентен

проценту идентичности между двумя последовательностями. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных позиций, совместно используемых последовательностями (т.е., % гомологии=количество идентичных позиций/общее количество позиций x 100), с учетом количества зазоров и длины каждого зазора, который необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с помощью математического алгоритма. Такая гомология хорошо представлена в данной области техники посредством инструментов и/или алгоритмов локального выравнивания, например, BLAST и/или BLAST 2.0 и может включать методы парного выравнивания, методы выравнивания множества последовательностей, методы структурного выравнивания и/или методы филогенетического анализа.

Используемые в настоящем описании термины «совместное введение», «совместно введенный» и «в комбинации с» могут относиться к введению субъекту по меньшей мере двух агентов или видов терапии. В некоторых вариантах одновременное введение двух или более агентов/видов терапии является одновременным. В других вариантах осуществления первый агент/терапия вводится перед вторым агентом/терапией. Специалистам в данной области понятно, что составы и/или пути введения различных используемых агентов/видов терапии могут меняться. Например, анти-ВИЧ-1 антитела по настоящему изобретению могут вводиться совместно друг с другом или могут вводиться совместно с другими антителами, например, другими нейтрализующими антителами широкого спектра действия, такими как, например, нейтрализующие анти-ВИЧ антитела широкого спектра действия, раскрытые в US 2014/0328862, например 3BNC117 или VRC01, описанные в патенте США 8 637 036, который включен в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки, или необязательно совместно с другими анти-ВИЧ агентами. Совместное введение может происходить или не происходить одновременно, например, одно или более анти-ВИЧ-1 антител по настоящему изобретению можно вводить до или после другого анти-ВИЧ-1 антитела по настоящему изобретению (или другого анти-ВИЧ антитела или других анти-ВИЧ агентов) или можно вводить в то же или по существу такое же время. Специалист в данной области поймет, что совместное введение не подразумевает ограничения по времени, поскольку оно предназначено для описания

введения вместе с другими соединениями и/или видами терапии в качестве части схемы лечения пациента.

Используемый в настоящем описании термин «анти-ВИЧ агент» может относиться к терапии для лечения ВИЧ, который сам по себе не включают анти-ВИЧ-1 антитела. Например, ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (NNRTI), нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (NRTI), ингибиторы протеаз (PI), ингибиторы слияния, антагонисты CCR5/ингибиторы проникновения, ингибиторы переноса интегразой (INSTI) и их комбинации, все являются «анти-ВИЧ агентами», поскольку они являются не основанными на антителах терапевтическими методами лечения, которые можно вводить совместно с одним или более анти-ВИЧ-1 антителами по настоящему изобретению и/или дополнительными анти-ВИЧ-1 антителами. Специалист в данной области техники поймет, что этот список не следует считать исчерпывающим, и, поскольку современные достижения и дополнительные способы обработки становятся доступными, они также входят в объем этого определения.

Используемый в настоящем описании термин «носители» может включать фармацевтически приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы, которые нетоксичны для клетки или млекопитающего, подвергающегося воздействию этих веществ, в используемых дозировках и концентрациях. Часто физиологически приемлемый носитель представляет собой водный pH-буферный раствор. Примеры физиологически приемлемых носителей включают, без ограничения, буферы, такие как фосфатный, цитратный и других органических кислот; антиоксиданты, включая, без ограничения, аскорбиновую кислоту; низкомолекулярный (из менее чем примерно 10 остатков) полипептид; белки, такие как, без ограничения, сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как, без ограничения, поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как, без ограничения, глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая, без ограничения, глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как, без ограничения, ЭДТА; сахарные спирты, такие как, без ограничения, маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как, без ограничения, натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как, без ограничения, Твин; полиэтиленгликоль (ПЭГ) и ПЛЮРОНИКи.

Термин «лечение» заболевания относится к выполнению

протокола, который может включать введение одного или более лекарственных веществ пациенту (человеку или кому-либо еще) для купирования признаков или симптомов заболевания. Купирование может произойти до проявления признаков или симптомов заболевания, а также после их появления. Таким образом, «лечение» включает «профилактику» заболевания. Термин «профилактика» относится к профилактическим и/или превентивным мерам, целью которых является предотвращение или замедление развития целевого патологического состояния или расстройства. Например, в случае заражения вирусом иммунодефицита 1 (ВИЧ-1), «профилактика» может происходить в ситуации предварительного прохождения курса лечения для предотвращения или блокирования заражения ВИЧ-1, например, пассивной вакцинацией. Такая «профилактика» также происходит в случае скрытой инфекции ВИЧ-1, например, у тех людей, которые являются сероположительными без проявления каких-либо симптомов (т.е., без прогрессирования до проявления симптомов СПИДа), при этом возможна профилактика развития активной инфекции и/или очистка пациента от указанной инфекции ВИЧ-1. Кроме того, «лечение» не обязательно приводит к полному купированию признаков или симптомов, излечению и, в частности, оно включает протоколы, которые оказывают лишь минимальное, но положительное воздействие на пациента.

Используемый в настоящем описании термин «эпитоп» может относиться к области антигена, с которой связывается антитело или Т-клетка, например к области оболочки вируса ВИЧ-1, включая гликопротеин, без ограничения, например gp120 или область на гликопротеине. «Антиген» относится к веществу, которое вызывает иммунологическую реакцию или связывается с продуктами этой реакции.

Термины «очищенное» или «выделенное» антитело, пептид, полипептид или белок относятся к пептиду, полипептиду или белку, как используется в настоящем описании, и могут относиться к пептиду, полипептиду или белку, который был отделен от других белков, липидов и нуклеиновых кислот, с которыми он связан в естественных условиях. Полипептид/белок может составлять, по меньшей мере, 10% (т.е. любой процент от 10% до 100%, например, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 95% и 99%) в расчете на сухую массу очищенного препарата. Чистота может быть измерена любым подходящим стандартным методом, например, колоночной хроматографией, электрофорезом в полиакриламидном геле или

анализом ВЭЖХ. Выделенный полипептид/белок (например, анти-ВИЧ-1 антитела), описанный в изобретении, может быть получен методами рекомбинантной ДНК.

B. Нейтрализующие анти-ВИЧ-1 антитела широкого спектра действия

Настоящее изобретение относится к нейтрализующим анти-ВИЧ-1 антителам широкого спектра действия (bNab) и их антигенсвязывающим частям. В частности, настоящее изобретение относится к нескольким различным моноклональным антителам, BG18, NC37 и BG1, их антигенсвязывающим частям, включая, без ограничения, их определяющие комплементарность области (CDR), а также их производным и вариантам, которые демонстрируют широкую и мощную нейтрализацию ВИЧ-1 *in vivo* (см. пример 1 ниже). Таким образом, анти-ВИЧ-1 антитела по настоящему изобретению обладают сильной терапевтической эффективностью в случае их применения либо по отдельности, либо в комбинации друг с другом, либо с другими bNab, либо с другими видами лечения ВИЧ, как обсуждалось в настоящем описании выше.

Каждое из BG18, NC37 и BG1 имеет различные неперекрывающиеся эпитопы. NC37 распознает CD4bs. NC37 и его клональные варианты демонстрируют характеристики bNAb, полученных как из V_H1-2, так и из V_H1-46; однако согласно результатам структурного анализа предполагается, что NC37 распознает Env по типу V_H1-46. Не желая быть связанными какой-либо теорией, предполагается, что длинный CDRH3 NC37 вступает в контакт с соседним протомером на тримере, распознавая тем самым четвертичный эпитоп тримера, ядро которого перекрывается с CD4bs.

BG1 связывается с областью V1V2 Env, другой часто встречающейся мишенью bNAb, возникающей во время естественной инфекции. BG1 представляет собой первое антитело в этом классе (bNab), выделенное из донора, инфицированного типом (филогенетической ветвью) B. Его активность сходна с членами семейства антител VRC26, такими как описано у N.A. Doria-Rose et al., Developmental pathway for potent V1V2-directed HIV-neutralizing antibodies. Nature 509, 55-62 (2014), но оно является менее эффективным, чем bNAb PG9/16 и PGDM1400. Как и другие bNAb V1V2, выделенные до настоящего времени, BG1 имеет длинный, богатый тирозином CDRH3.

BG18, наиболее эффективное из BG18, NC37 и BG1, и

направлено на $Asn332_{gp120}$-центрированный гликановый участок у основания петли V3. Это – сильно гликозилированная область, которая включает углеводы в положениях $Asn332_{gp120}$, $Asn301_{gp120}$, $Asn386_{gp120}$, $Asn392_{gp120}$, $Asn137_{gp120}$, $Asn156_{gp120}$. Был выделен ряд моноклональных bNAb, которые связываются как с белковыми, так и с углеводными компонентами в этом участке, включая PGT121-124, описанного у L.M. Walker et al., Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. Nature 477, 466-470 (2011), и 10-1074, описанного у H. Mouquet et al., Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109, E3268-3277 (2012). Все эти bNAb были выделены из донора, инфицированного типом A, и могут быть подразделены на антитела, которые связываются исключительно с гликаном $Asn332_{gp120}$ (10-1074 и PGT124), и те, которые также связываются с окружающими гликанами в гликановом участке V3 (PGT121-123). BG18 и его клональные варианты похожи на 10-1074 в том смысле, что они задействуют $Asn332_{gp120}$, но BG18 является более эффективным, чем опубликованные bNAb к V3, и впервые был выделен из донора, инфицированного типом B.

BG18 отличается от ранее охарактеризованных представителей этого класса удивительно характерной для него ориентацией CDRH3 и домена легкой цепи. Кроме того, BG18 отличается от других членов этой группы антител тем, что он имеет более короткий CDRH3 и не содержит вставок или делеций, хотя, не желая быть связанными какой-либо теорией, можно предположить, что BG18-подобные антитела легче генерируются. В отсутствие структуры высокого разрешения комплекса BG18-Env трудно предсказать, как более короткий CDRH3 BG18 взаимодействует с Env. Структурные исследования комплексов Env с Fab PGT122 и 10-1074 показывают, что они приближаются к протомерам gp120 в тримере Env примерно под одинаковыми углами, приблизительно перпендикулярными. ЭМ-структура BG18-Env, хотя и не имеет достаточного разрешения для более точного определения типа взаимодействий, тем не менее демонстрирует, что BG18 приближается к Env под другим углом, который смещен на 40° к промотору gp120 относительно углов сближения 10-1074 и PGT122. Клональные варианты и производные BG18, включая 354BG8, 354BG18, 354BG42, 354BG33, 354BG129, 354BG188, 354BG411 и 354BG426, а также их полноразмерные последовательности, определяющие комплементарность области

тяжелой и легкой цепей (CDR), приведены ниже в таблице 1. Дендрограмма вариантов BG18 представлена на фиг. 6 и обсуждается в приведенном ниже примере 1. Клональные варианты и производные BG1, включая BG1, BG22 и BG47, вместе с их полноразмерными последовательностями, определяющими комплементарность областями тяжелых и легких цепей (CDR), приведены ниже в таблице 2.

Название	**SEQ ID NO:**	**Последовательность**
354BG8IgH	1	EVQLRESGPRLVKPSETLSLSCDVFGDSRPSDHSWTWVRQPPGK ALEWIGDVHYNGDNTYNPSLRGRVKIDVDRSTHRFSLTLKSLTA ADTGIYFCARNVIRVFGVISLGEWFHYGMDVWGPGTAVIVSS
CDR1	2	GDSRPSDHS
CDR2	3	VHYNGDN
CDR3	4	NVIRVFGVISLGEWFHYGMDV
354BG8 IgL	5	SSELTQAPSVSVSPGQTATIACSGPPLASRYTYWYRQKPGQAPV LIIFRDRQFPSGVSGRFSASKSGTTATLTIRDVQVEDEGDYYCQ SSDTSDSYKMFGGGTTLTVL
CDR1	6	PLASRY
CDR2	7	RDR
CDR3	8	QSSDTSDSYKM
354BG18 IgH	9	QVQLRESGPGLVKPSETLSLSCTVSNDSRPSDHSWTWVRQSPGK ALEWIGDIHYNGATTYNPSLRSRVRIELDQSIPRFSLKMTSMTA ADTGMYYCARNAIRIYGVVALGEWFHYGMDVWGQGTAVTVSS
CDR1	10	NDSRPSDHS
CDR2	11	IHYNGAT
CDR3	12	NAIRIYGVVALGEWFHYGMDV
354BG18 IgL	13	SSELTQPPSVSVSPGQTARITCSGAPLTSRFTYWYRQKPGQAPV LIISRSSQRSSGWSGRFSASWSGTTVTLTIRGVQADDEADYYCQ SSDTSDSYKMFGGGTKLTVL
CDR1	14	PLTSRF
CDR2	15	RSS
CDR3	16	QSSDTSDSYKM
354BG42 IgH	17	EVQLRESGPGLVKPSETLSLSCDVFGDSRPSDHSWTWVRQPPGK ALEWIGDVHYNGDTTYNPSLRGRVKIDVDRSTHRFSLTLNSLTA ADTGIYFCARNVIRVFGVISLGEWFHYGMDVWGQGTAVTVSS

CDR1	18	GDSRPSDHS
CDR2	19	VHYNGDT
CDR3	20	NVIRVFGVISLGEWFHYGMDV
354BG42 IgL	21	SSELTQAPSVSVSPGQTATIACSGPPLASRYTYWYRQKPGQAPV LIIFRDRQFPSGVSGRFSASKSGTTATLTIRDVQVEDEGDYYCQ SSDTSDSYKMFGGGTTLTVL
CDR1	22	PLASRY
CDR2	23	RDR
CDR3	24	QSSDTSDSYKM
354BG33 IgH	25	QVQLRESGPGLVKPSETLSLTCTVSNDSRPSDHSWTWVRQSPGK ALEWIGDIHYNGATTYNPSLRSRVRIELDQSIPRFSLKMTSMTA ADTGMYYCARNAIRIYGVVALGEWFHYGMDVWGQGTAVTVSS
CDR1	26	NDSRPSDHS
CDR2	27	IHYNGAT
CDR3	28	NAIRIYGVVALGEWFHYGMDV
354BG33 IgL	29	SSELTQPPSVSVSPGQTAKITCSGAALTSRFTYWYRQKPGQAPV LIISRTSQRSSGWSGRFSASWSGTTVTLTIRGVQADDEGDYYCQ SSDTSDSYKMFGGGTKLTVL
CDR1	30	ALTSRF
CDR2	31	RTS
CDR3	32	QSSDTSDSYKM
354BG129 IgH	33	EVQLRESGPGLVKPSGNMALTCTISGDSRPSDHSWTWVRQSPGK ALEWIGDIHYGGDITYNPSLRSRVKLEVDTSTNRFFLKMTSLTV ADTGIYFCARNVIRVFGVIALGEWFHYGMDVWGQGTAITVSP
CDR1	34	GDSRPSDHS
CDR2	35	IHYGGDI
CDR3	36	NVIRVFGVIALGEWFHYGMDV
354BG129 IgL	37	SSELTQTPSVTVSPGETARIACSGPPLASRYCYWYRQKPGQAPV LIIFRDRQFSSGMSGRFASSHSGTTVTLTIRDVRVEDEADYYCQ SSDINDSYKMFGGGTKVTVL
CDR1	38	PLASRY
CDR2	39	RDR
CDR3	40	QSSDINDSYKM
354BG188 IgH	41	EVQLRESGPGLVKPSGNMALTCTISGDSRPSDHSWTWVRQSPGK TLEWIGDIHYGGDITYNPSLRSRVKLEVDTSSNRFFLKMTSLTV

		ADTGIYFCARNVIRVFGVIALGEWFHYGMDVWGQGTAITVSP
CDR1	42	GDSRPSDHS
CDR2	43	IHYGGDI
CDR3	44	NVIRVFGVIALGEWFHYGMDV
354BG188 IgL	45	SSELTQTASVTVSPGETARIACSGPPLASRYCYWYRQKPGQAPV LIIFRDRQFSSGISGRFSSSQSGTTVTLTIRDVRVEDEADYYCQ SSDTSDSFKMFGGGTKLTVL
CDR1	46	PLASRY
CDR2	47	RDR
CDR3	48	QSSDTSDSFKM
354BG411 IgH	49	QVQLRESGPGLVKPSGNMALTCTISGDSRPSDHSWTWVRQSPGK ALEWIGDIHYGGDITYNPSLRSRVELEVDRSTNRFFLKMTSLSV ADTGMYFCARNVIRVFGVIALGEWFHYGMDVWGQGTAITVSP
CDR1	50	GDSRPSDHS
CDR2	51	IHYGGDI
CDR3	52	NVIRVFGVIALGEWFHYGMDV
354BG411 IgL	53	SSELTQAPSVTVSPGDTARIACSGPPLATRYCYWYRQKSGQAPV LIIFRDRQFSSGVSGRFSSSQSGSTVTLTIRDVRVEDEADYYCQ SSDTSDSYKMFGGGTKLTVL
CDR1	54	PLATRY
CDR2	55	RDR
CDR3	56	QSSDTSDSYKM
354BG419 IgH	57	QVQLRESGPGLVKPSETLSLSCDVFGDSRPSDHSWTWVRQPPGK ALEWIGDIHYNGDKTYNPSLRGRVKIDVDRSTHRFSLTLNSLTA ADTGMYFCARNVIRVFGVISLGEWFHYGMDVWGPGTAVTVSS
CDR1	58	GDSRPSDHS
CDR2	59	IHYNGDK
CDR3	60	NVIRVFGVISLGEWFHYGMDV
354BG419 IgL	61	SSELTQAPSVSVSPGQTARIACSGPPLASRYTYWYRQKPGQAPV LIIFRDRQFPSGVSGRFSASKSGTTGTLTIRDVQAEDEGDYYCQ SSDTSDSYKMFGGGTTLTVL
CDR1	62	PLASRY
CDR2	63	RDR
CDR3	64	QSSDTSDSYKM
354BG426	65	QVQLRESGPGLVKPSGNMALTCTISGDSRPSDHSWTWVRQSPGK

IgH		ALEWIGDIHYGGDITYNPSLRSRVKLEVDTSSNRFFLKMTSLTV ADTGIYFCARNVIRVFGVIALGEWFHYGMDVWGQGTAITVSP
CDR1	66	GDSRPSDHS
CDR2	67	IHYGGDI
CDR3	68	NVIRVFGVIALGEWFHYGMDV
354BG426 IgL	69	SSELTQAPSVTLSPGETARIACSGPPLASRYCYWYRQKPGQAPV LIIFRDRQFSSGISGRFSSSQSGTTVTLTIRDVRVEDEADYYCQ SSDNSDSFKMFGGGTKLTVL
CDR1	70	PLASRY
CDR2	71	RDR
CDR3	72	QSSDNSDSFKM

Таблица 1. Последовательности вариантов BG18

Название	**SEQ ID NO:**	**Последовательность**
BG1IgH	73	AEQLVESGGGLVPPGRSLRLSCSASGFYFPDYAMAWVRQAPGQ GLQWVGFMRGWAYGGSAQFAAFAVGKFAISRDDGRNVVYLDVK NPTFEDTGVYFCAREQRNKDYRYGQEGFGYSYGMDVWGRGTTV VVST
CDR1	74	GFYFPDYA
CDR2	75	MRGWAYGGSA
CDR3	76	EQRNKDYRYGQEGFGYSYGMDV
BG1 IgL	77	DIHMTQSPVSLSASVGDRVTITCRASHFIANYVNWYQQKPGKA PTLLIFESSTLQRGVPSRFSAYGDGTEFTLSINTLQPEDFASY ICQQSHSPPVTFGAGTRVDQK
CDR1	78	HFIANY
CDR2	79	ESS
CDR3	80	QQSHSPPVT
BG22 IgH	81	EERLVESGGGLVPPGRSLRLSCSAFDFYFPDYAMAWVRQAPGK GLEWIGFIRGWAYGQAAQYGKSASGRMTISRDDSRRVVYLDIK SPIEEDTGAYFCAREQRGGDGRYSGDGFGYPYGMDVWGRGTMV TVSA
CDR1	82	DFYFPDYA
CDR2	83	IRGWAYGQAA
CDR3	84	EQRGGDGRYSGDGFGYPYGMDV
BG22 IgL	85	DILMTQSPVSLSASIGERITITCRASHFIANYVNWYQQRPGKA

		PKLLIFQSWTLNRGIPSRFSGYGDGTEFTLSISALQSEDFGTY ICQQSHSPPLSFGGGTRVDQT
CDR1	86	HFIANY
CDR2	87	QSW
CDR3	88	QQSHSPPLS
BG47 IgH	89	EERLVESGGGLVPPGRSLRLSCSAFDFYFPDYAMAWVRQAPGR ALEWIGFIRGWAYGQSAQYGKSASGRMTISRDDSRRVVYLDIK SPTHEDTGVYFCAREQRGANGRYGGDGFGYSYGMDVWGRGTMV SVSA
CDR1	90	DFYFPDYA
CDR2	91	IRGWAYGQSA
CDR3	92	EQRGANGRYGGDGFGYSYGMDV
BG47 IgL	93	DIQMTQSPFTLSASVGERVTITCRASHFIANYVNWYQQRPGRA PKLLIFESSTLNRGVPSRFSGSGDGTEFTLSISALQSEDFATY ICQQSHSPPVSFGGGTRVDQT
CDR1	94	HFIANY
CDR2	95	ESS
CDR3	96	QQSHSPPVS

Таблица 2. Последовательности вариантов BG1

Специалист в данной области поймет, что определяющие комплементарность области («CDR») большинства антител, например NC37, BG1, включая все варианты BG1, и BG18, в том числе все варианты BG18, в значительной степени определяют биологическую активность антитела, образуя паратоп на антителе, причем CDRH3 обладает наиболее специфическим характером. Соответственно, антитела по настоящему изобретению могут содержать NC37, его CDR, BG1, его CDR и BG18 и его CDR, включая все варианты NC37, BG1 и BG18 и их соответствующих CDR. Специалист в данной области также поймет, что антитела по настоящему изобретению могут содержать консервативные замены, в том числе в CDR, и при этом оставаться в рамках изобретения. Соответственно, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к антителам и их антигенсвязывающим частям, экспрессирующим CDR, перечисленным в таблицах 1 и 2.

Например, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к антителам или их антигенсвязывающим частям, имеющим тяжелую цепь, содержащую одну или более из SEQ

ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81 и 89 или имеющую определенную степень гомологии с одной или более из SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81 и 89, например по меньшей мере, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и любые их промежуточные диапазоны. Одна или более из SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81 и 89 могут иметь консервативные замены. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к антителам или их антигенсвязывающим частям, имеющим легкую цепь, содержащую одну или более из SEQ ID NO: 5, 13, 21, 20, 37, 45, 53, 61, 69, 77, 85 и 93 или имеющую определенную степень гомологии с одной или более из SEQ ID NO: 55, 13, 21, 20, 37, 45, 53, 61, 69, 77, 85 и 93, например, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и любые их промежуточные диапазоны. Одна или более из SEQ ID NO: 5, 13, 21, 20, 37, 45, 53, 61, 69, 77, 85 и 93 могут иметь консервативные замены.

Тяжелые цепи IgG обычно имеют размер от примерно 400 до примерно 600 аминокислот, более типично от 450 до примерно 550 аминокислот. Вариабельная область каждой тяжелой цепи, независимо от класса антител, обычно имеет длину примерно 100-140 аминокислот, наиболее типично примерно 110-130 аминокислот. Легкие цепи обычно имеют длину примерно 210-220 аминокислот, более типично 211-217. Вариабельная область легких цепей обычно имеет длину примерно 100-120 аминокислот.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к антителам или их антигенсвязывающим частям, имеющим одну или более CDR в тяжелой цепи, содержащие одну или более из SEQ ID NO: 2-4, 10-12, 18-20, 26-28, 34-36, 42-44, 50-52, 58-60, 66-68, 74-76, 82-84 и 90-92 или имеющие определенную степень гомологии с одной или более из SEQ ID NO: 2-4, 10-12, 18-20, 26-28, 34-36, 42-44, 50-52, 58-60, 66-68, 74-76, 82-84 и 90-92, например, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и любые их промежуточные диапазоны. Одна или более из SEQ ID NO: 2-4, 10-12, 18-20, 26-28, 34-36, 42-44, 50-52, 58-60, 66-68, 74-76, 82- 84 и 90-92 могут иметь консервативные замены.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к антителам или их антигенсвязывающим частям, имеющим одну или более CDR в легкой цепи, содержащие одну или более из SEQ ID NO: 6-8, 14-16, 22-24, 30-32, 38-40, 46-48, 54-56, 62-64, 70-72, 78-80, 86-88 и 94-96 или имеющие определенную степень

гомологии с одной или более из SEQ ID NO: 6-8, 14-16, 22-24, 30-32, 38-40, 46-48, 54-56, 62-64, 70-72, 78-80, 86-88 и 94-96, например, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и любые их промежуточные диапазоны. Одна или более из SEQ ID NO: 6-8, 14-16, 22-24, 30-32, 38-40, 46-48, 54-56, 62-64, 70-72, 78-80, 86-88 и 94-96 могут иметь консервативные замены.

Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут состоять из антигенсвязывающих частей, например CDR, из разных отдельных bNab, включая, без ограничения, bNab по настоящему изобретению. Исключительно в качестве примера, сконструированное производное может содержать легкую цепь одного из NC37, BG1 или BG18, включая любые варианты, и тяжелую цепь другого bNab, включая одно из NC37, BG1 или BG18, в том числе любые варианты. Альтернативно, сконструированное производное может содержать легкую цепь одного варианта BG18 и тяжелую цепь другого варианта BG18. Специалист в данной области поймет, что способы получения рекомбинантных антител допускают значительное количество рекомбинантных антител, каждое из которых однозначно находится в пределах объема настоящего изобретения. Соответственно, bNab по настоящему изобретению могут быть получены методами рекомбинантной ДНК, такими как описано в патенте США No. № 4,816,567. ДНК, кодирующая моноклональные антитела по изобретению, может быть легко выделена и секвенирована с помощью традиционных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышиных антител). После выделения ДНК может быть помещена в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки миеломы, которые иным образом не продуцируют белок иммуноглобулина, для обеспечения синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. ДНК также может быть модифицирована, например, путем ковалентного присоединения к кодирующей последовательности иммуноглобулина всей или части кодирующей последовательности не относящегося к иммуноглобулину полипептида. Такой не относящийся к иммуноглобулину полипептид может быть заменен константными доменами антитела по изобретению или может быть заменен вариабельными доменами одного антигенсвязывающего сайта антитела по изобретению для создания химерного бивалентного антитела.

После получения, рекомбинантным или иным образом, анти-ВИЧ-1 антитела могут быть очищены или выделены, так чтобы антитела по существу не содержали, например, никакой сыворотки, супернатанта или других клеточных культур или родственных материалов. Методы очистки антител известны в данной области и могут включать методы селективного обогащения или специфического выделения. Например, может быть использована аффинная очистка, такая как очистка, основанная на класс-специфическом сродстве. Сначала также можно использовать методы фракционирования, облегчающие выделение подмножества образцов белков, которые включают иммуноглобулины. Как правило, антиген-специфическое сродство применяется для выделения антител, которые связываются с антигеном. Затем антитела могут быть объединены с носителем, буфером, разбавителем, растворителем и/или консервантами и т.д., которые служат для создания фармацевтически приемлемых композиций анти-ВИЧ-1 антител.

Антитела могут представлять собой моновалентные антитела. Способы получения моновалентных антител хорошо известны в данной области. Например, один из способов включает рекомбинантную экспрессию легкой цепи иммуноглобулина и модифицированной тяжелой цепи. Тяжелая цепь обычно обрезается в любой точке Fc-области для предотвращения сшивки тяжелой цепи. Альтернативно, соответствующие цистеиновые остатки замещают другим аминокислотным остатком или удаляют, чтобы предотвратить сшивку. Для получения моновалентных антител также подходят способы *in vitro*. Расщепление антител для получения их фрагментов, в частности фрагментов Fab, может быть выполнено обычными методами, известными в данной области техники.

Человеческие моноклональные антитела могут быть получены различными методами, известными в данной области, включая библиотеки фагового дисплея [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)]. Для получения человеческих моноклональных антител также доступны доступны способы, описанные Cole et al. и Boerner et al. (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) и Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]. Аналогично, человеческие антитела могут быть получены путем введения локусов человеческого иммуноглобулина в организм трансгенных животных, например мышей, у которых эндогенные гены иммуноглобулина были частично или полностью

инактивированы. При заражении наблюдается продуцирование человеческих антител, которые во всех отношениях сильно похожи на антитела, образующиеся у людей, включая перегруппировку генов, сборку и репертуар антител. Этот подход описан, например, в патентах США №№ 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5661016 и в следующих научных публикациях: Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к векторам и системам векторов, содержащим нуклеотидные последовательности, которые кодируют вариабельные области, включая, без ограничения, CDR анти-ВИЧ-1 антител по настоящему изобретению, например NC37, BG1 и BG18, в том числе любые варианты, и их антигенсвязывающих частей. Вектор может быть, например, но не обязательно, плазмидой; в данной области известны и другие рекомбинантные векторы и могут включать, например, фаговые векторы, такие как λ-фаговый вектор, другие вирусные векторы, такие как нереплицирующийся аденовирусный вектор, космиды и/или искусственные хромосомы. Векторная система может быть или может не быть отдельно индуцируемой, т.е., может иметь разные промоторные и/или репрессорные элементы. Общим для большинства сконструированных векторов являются источники репликации, сайты мультиклонирования и селектируемые маркеры, при условии, что вектор (включая системы векторов, например, множественные плазмиды) содержит такую систему, и считается, что он входит в объем настоящего изобретения. Специалисту в данной области понятно, что можно получить последовательности нуклеиновых кислот из заданной пептидной последовательности и клонировать их в систему выбора. Соответственно, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к вектору или системе векторов, содержащих одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих одну или более из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33 , 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 73, 77, 81, 85, 89 и 93. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к вектору или системе векторов, содержащих одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих одну или

более CDR одной или более тяжелых и/или легких цепей одного или более анти-ВИЧ-1 антител по настоящему изобретению, например нуклеотидной последовательности или последовательностям, кодирующим одну или более из SEQ ID NO: 2-4, 6-8, 10-12, 14-16, 18-20, 22-24, 26-28, 30-32, 34-36, 38-40, 42-44, 46-48, 50-52, 54-56, 58-60, 62-64, 66-68, 70-72, 74-76, 78-80, 82-84, 86- 88, 90-92 и 94-96 и их комбинации. Эти нуклеотиды, кодирующие тяжелые/легкие цепи и/или CDR, могут иметь консервативные замены, а нуклеотиды, кодирующие CDR, независимо от таких консервативных замен, могут обладать определенной степенью гомологии (например, по меньшей мере, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) с этими нуклеотидными последовательностями. Вектор или система векторов по настоящему изобретению может быть введена в одну или более клеток (т.е. клетки являются «трансформироваными» вектором), и такие способы известны в данной области техники.

C. Фармацевтические составы и доставка

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к фармацевтическим композициям, содержащим по меньшей мере одно анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающую часть по настоящему изобретению, а также к способам их применения для лечения нуждающегося в этом пациента. Пациент может иметь скрытую или активную инфекцию ВИЧ-1. Анти-ВИЧ-1 антитела или их антигенсвязывающие части, используемые в этих композициях и способах, могут быть любыми анти-ВИЧ-1 антителами или их антигенсвязывающими частями по настоящему изобретению, но особенно полезными являются такие анти-ВИЧ антитела или их антигенсвязывающие части, которые содержат BG18 или его варианты, включая варианты, полученные рекомбинантным способом, и/или его сконструированные производные.

Фармацевтически приемлемая композиция анти-ВИЧ-1 антитела или его антигенсвязывающей части, подходящая для введения пациенту, может содержать эффективное количество анти-ВИЧ-1 антитела или антител или их антигенсвязывающих частей в составе, который сохраняет биологическую активность, при этом обеспечивая максимальную стабильность при хранении в приемлемом температурном диапазоне. Фармацевтические композиции могут также включать, в зависимости от целевого состава, фармацевтически приемлемые разбавители, фармацевтически приемлемые носители и/или фармацевтически приемлемые наполнители, или любую такую

несущую среду, обычно используемую для приготовления фармацевтических композиций для введения животным или людям. Разбавитель выбирают таким образом, чтобы он не влиял на биологическую активность комбинации. Примерами таких разбавителей являются дистиллированная вода, забуференный фосфатом физиологический раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и раствор Хэнка. Количество наполнителя, которое используется в фармацевтической композиции или составе по настоящему изобретению, представляет собой количество, которое служит для равномерного распределения антитела по всей композиции, чтобы его можно было равномерно диспергировать при доставке нуждающемуся в этом субъекту. Он может служить для разбавления антитела до концентрации, которая обеспечивает целевые полезные паллиативные или лечебные результаты, при этом сводя к минимуму любые побочные эффекты, которые могут возникнуть при слишком высокой концентрации. Он также может иметь эффект консерванта. Таким образом, для антител, имеющих высокую физиологическую активность, можно использовать наполнитель в более высоких количествах. С другой стороны, для любого активного ингредиента(ов), который проявляет более низкую физиологическую активность, будет использоваться меньшее количество наполнителя.

Фармацевтически приемлемая композиция может быть в жидкой или твердой форме. Твердый состав обычно, но не обязательно, лиофилизируют и превращают в раствор перед введением для однократного или многократного дозирования. Составы не должны подвергаться воздействию экстремальных температур или pH во избежание термической денатурации. Таким образом, важно приготовить композицию антител по настоящему изобретению в биологически значимом диапазоне pH. Часто необходим забуференный раствор для поддержания надлежащего диапазона pH во время хранения, особенно для жидких составов, хранящихся в течение более длительных периодов времени, начиная с момента их приготовления до введения. Как правило, жидкие и твердые составы требуют хранения при более низких температурах (обычно 2-8°C) для сохранения стабильности в течение более длительных периодов времени. Приготовленные композиции антител, особенно жидкие составы, могут содержать бактериостат для предотвращения или минимизации протеолиза во время хранения, включая, без ограничения, эффективные концентрации (обычно <1% мас./об.)

бензилового спирта, фенола, м-крезола, хлорбутанола, метилпарабена и/или пропилпарабена. Бактериостат может быть противопоказан некоторым пациентам. Следовательно, лиофилизированный состав может быть восстановлен в растворе, содержащем или не содержащем такой компонент. К забуференной жидкой или твердой композиции антител могут быть добавлены дополнительные компоненты, включая, без ограничения, сахара в качестве криопротектора (включая, без ограничения, полигидроксилированные углеводороды, такие как сорбит, маннит, глицерин и дульцит, и/или дисахариды, такие как сахароза, лактоза, мальтоза или трегалоза) и, в некоторых случаях, соответствующую соль (включая, без ограничения, NaCl, KCl или LiCl). Такие составы антител, особенно жидкие составы, предназначенные для длительного хранения, готовят с учетом полезного диапазона общей осмолярности как для обеспечения стабильности при температуре 2-8°C или выше в течение длительного периода времени, так и для получения состава, пригодного для парентеральной инъекции. Например, но не обязательно, эффективный диапазон общей осмолярности (общее количество молекул в растворе) может составлять от примерно 200 мОс/л до примерно 800 мОс/л. Очевидно, что количество цирропротектора, такого как сахароза или сорбит, будет зависеть от количества соли в композиции из расчета, чтобы общая осмолярность раствора оставалась в соответствующем диапазоне. Следовательно, не содержащий соль состав может, но не обязательно, содержать от примерно 5% до примерно 25% сахарозы.

Альтернативно, бессолевой состав на основе сорбита может, но не обязательно, содержать сорбит в диапазоне от примерно 3% до примерно 12%. Для бессолевых составов может потребоваться увеличенный диапазон соответствующего криопротектора для поддержания эффективных уровней осмолярности. Эти составы могут также содержать двухвалентный катион (включая, но не обязательно, $MgCl_2$, $CaCl_2$ и $MnCl_2$); и поверхностно-активное вещество, не являющееся ионным ПАВ 32 (включая, без ограничения, полисорбат-80 (Твин 80®), полисорбат-60 (Твин 60®), полисорбат-40 (Твин 40®) и полисорбат-20 (Твин 20®), полиоксиэтиленалкиловые простые эфиры, включая, без ограничения, Brij 58®, Brij 35®, а также другие, такие как Triton X-100®, Triton X 114®, NP40®, Span 85 и ряд неионных поверхностно-активных веществ серии Плюроник (например, Плюроник 121)). Любая

комбинация таких компонентов, включая необязательное включение бактериостата, может быть полезна для заполнения антителосодержащих составов по настоящему изобретению. Анти-ВИЧ-1 антитела или их антигенсвязывающие части по настоящему изобретению также могут представлять собой «химическое производное», которое представляет антитела, содержащие дополнительные химические фрагменты, в нормальных условиях не являющиеся частью молекулы иммуноглоблюлина (например, пегилирование). Такие фрагменты могут улучшать растворимость, увеличивать период полураспада, улучшать абсорбцию и т.д. основной молекулы. Альтернативно, такие фрагменты могут ослаблять нежелательные побочные эффекты основной молекулы или уменьшать токсичность основной молекулы.

Для лечения *in vivo* пациенту вводят или предоставляют фармацевтическую композицию, включающую, по меньшей мере, одно анти-ВИЧ антитело или его антигенсвязывающую часть по настоящему изобретению. Анти-ВИЧ антитела или их антигенсвязывающие части по изобретению, когда используется для терапии *in vivo*, вводят пациенту в терапевтически эффективных количествах (т.е. в количествах, которые устраняют или уменьшают общую вирусную нагрузку, как описано ниже в примере 1). Антитела вводят пациенту-человеку известными способами, такими как внутривенное введение, например, в виде болюса или путем непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, внутримышечным, внутрибрюшинным, интрацероброспинальным, подкожным, внутрисуставным, внутрисиновиальным, интратекальным, пероральным, местным способами введения или путем ингаляции. Антитела или их антигенсвязывающие части могут быть введены парентерально, если возможно, в целевой участок клеток или внутривенно. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят внутривенно или подкожно. Терапевтические композиции по изобретению можно вводить пациенту или субъекту системно, парентерально или местно. Вышеуказанные параметры для оценки успешного лечения и улучшения заболевания легко поддаются измерению с помощью обычных процедур, знакомых врачу.

Для парентерального введения анти-ВИЧ-1 антитела или их антигенсвязывающие части могут быть приготовлены в виде дозированной лекарственной формы для инъекций (раствора, суспензии, эмульсии) в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем для парентерального введения. Примеры таких носителей

включают, без ограничения, воду, физиологический раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и 5% человеческий сывороточный альбумин. Неводные носители включают, без ограничения, нелетучие масла и этилолеат. В качестве носителей могут быть использованы липосомы. Носитель может содержать незначительные количества добавок, таких как вещества, которые повышают изотоничность и химическую стабильность, такие как, например, буферы и консерванты.

Анти-ВИЧ-1 антитела или их антигенсвязывающие части по настоящему изобретению можно вводить хозяину любым способом, с помощью любой стратегии и/или комбинации, которые доступны в данной области, в количествах, достаточных для обеспечения терапевтического лечения ВИЧ-1. Эти композиции могут быть доставлены индивидууму различными путями введения, известными в данной области, в частности путем парентерального введения, а также, без ограничения, не парентеральными способами введения, такими как внутривенное (IV), внутримышечное (IM) или подкожное (SC) введение, причем внутривенное введение является нормой в области терапевтического введения антител. Эти композиции можно вводить в виде отдельных или многократных доз (т.е., введение антитела дозами, разнесенных по времени, охраняя стерильность композиции в течение режима лечения).

Доза и режим дозирования зависят от множества факторов, легко определяемых врачом, таких как природа инфекции, например, ее терапевтический индекс, состояние пациента и его история болезни. Обычно пациенту вводят терапевтически эффективное количество антитела. В некоторых вариантах осуществления количество вводимого антитела находится в диапазоне от примерно 0,001 мг/кг до примерно 100 мг/кг массы тела пациента и в любом интервале между ними. В зависимости от типа и тяжести инфекции, от примерно 0,1 до примерно 50 мг/кг массы тела (например, примерно 0,1-15 мг/кг/доза) антитела представляет собой начальную возможную дозу, вводимую пациенту либо, например, в виде одного или более отдельных введений, либо в виде непрерывной инфузии. Анти-ВИЧ-1 антитела могут доставляться с относительно низкими объемными скоростями, например, но необязательно, от примерно 0,001 мл/сутки до 10 мл/сутки, для минимизации повреждения или травмирования ткани вблизи места высвобождения состава. В случае малой дозы состав может высвобождаться со скоростью, в зависимости от конкретного

биологического агента(ов), например, от примерно 0,01 мкг/час или 0,1 мкг/час, 0,25 мкг/час, 1 мкг/час до, как правило, примерно 200 мкг/час, или препарат может доставляется с низкой объемной скоростью, например, объемной скоростью от примерно 0,001 мл/сутки до примерно 1 мл/сутки, например, от 0,01 микрограмма в сутки до примерно 20 миллиграммов в сутки. Доза зависит от ряда факторов, таких как активность, биодоступность и токсичность используемого активного ингредиента (например, анти-ВИЧ-1 антитела или его антигенсвязывающих частей) и требований субъекта. Прогресс этой терапии легко отслеживается с помощью обычных методов и анализов и основан на критериях, известных врачу или другим специалистам в данной области. Вышеуказанные параметры для оценки успешного лечения и улучшения состояния при заболевании легко поддаются измерению с помощью обычных процедур, знакомых врачу.

Конкретные варианты осуществления для среды доставки анти-ВИЧ-1 антител по настоящему изобретению включают микросферы PLGA, как обсуждается в настоящем описании и как известно в данной области техники, а также неразлагаемые носители на полимерной основе, содержащие поли(этилен-винилацетат); PEVAc). Кроме того, обзор контролируемого высвобождения и локализованной доставки терапевтических продуктов на основе антител можно найти у Grainger, et al., 2004, Expert Opin. Biol. Ther. 4(7):1029-1044). Подходящие микрокапсулы, позволяющие инкапсулировать антитело, могут также включать гидроксиметилцеллюлозу или желатиновые микрокапсулы и полиметилметакрилатные микрокапсулы, полученные методами коацервации или межфазной полимеризации. См. публикацию PCT WO 99/24061, озаглавленную «Способ получения составов с пролонгированным высвобождением IGF-1», согласно которой белок инкапсулирован в микросферах PLGA, этот документ включен в настоящее описание во всей полноте в виде ссылки. Кроме того, также могут быть использованы микроэмульсии или коллоидные системы доставки лекарственных веществ, такие как липосомы и микросферы альбумина. В других предпочтительных композициях с замедленным высвобождением используется биоадгезив для удержания антитела в месте введения. Как отмечалось выше, состав с замедленным высвобождением может содержать биоразлагаемый полимер, в который помещено антитело и который может обеспечить задержанное высвобождение. Неинъецируемые устройства могут упоминаться в настоящей заявке как «имплантат»,

«фармацевтический депо-имплантат», «депо-имплантат», «неинъецируемое депо» или может быть обозначено аналогичным термином. Обычные депо-имплантаты могут включать, без ограничения, твердые биоразлагаемые и небиоразлагаемые полимерные устройства (такие как удлиненные полимерные или коаксиальные стержнеобразные устройства), а также многочисленные насосные системы, также известные в данной области техники. Инъецируемые устройства подразделяются на болюсные инъекции (высвобождение и рассеяние лекарственного вещества после инъекции) и инъекции хранилища или депо, которые обеспечивают резервуар для хранения в месте инъекции, обеспечивая постепенное высвобождение биологического агента с течением времени. Депо-имплантат может быть хирургически установлен в точке доставки для обеспечения адекватного резервуара для длительного высвобождения антитела с течением времени. Такое устройство способно нести лекарственный состав в таких количествах, которые терапевтически или профилактически необходимы для лечения в течение предварительно выбранного периода времени. Депо-имплантат также может обеспечивать защиту препарата от разрушения под воздействием процессов организма (таких как протеазы) на время лечения. Как известно в данной области техники, термин «замедленное высвобождение» относится к постепенному (непрерывному или прерывистому) высвобождению такого агента из блок-полимерной матрицы в течение продолжительного периода времени. Независимо от конкретного устройства, замедленное высвобождение композиции обеспечивает локальные биологически эффективные концентрации антитела. Длительное высвобождение биологического агента(ов) может происходить в течение одного дня, нескольких дней, недели или более; но, вероятнее всего, в течение месяца или более, или примерно до шести месяцев, в зависимости от состава. Природные или синтетические полимеры, известные в данной области техники, могут быть полезны в качестве депо-имплантата благодаря таким характеристикам, как универсальная кинетика деградации, безопасность и биосовместимость. Этими сополимерами можно манипулировать, чтобы модифицировать фармакокинетику активного ингредиента, защитить агент от ферментативного воздействия, а также обеспечения их деградации со временем в месте прикрепления или инъекции. Специалист в данной области поймет, что в данной области техники имеется множество идей по манипуляции свойствами

этих сополимеров, включая соответствующий процесс производства, используемые катализаторы и конечную молекулярную массу депо-имплантата с замедленным высвобождением или депо-инъекции. Природные полимеры включают, без ограничения, белки (например, коллаген, альбумин или желатин); полисахариды (целлюлозу, крахмал, альгинаты, хитин, хитозан, циклодекстрин, декстран, гиалуроновую кислоту) и липиды. Биоразлагаемые синтетические полимеры могут включать, без ограничения, различные сложные полиэфиры, сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, Biopolymers 22:547-556), полилактиды ([PLA]; патент США US 3773919 и EP 058481), полигликолят полилактата (PLGA), такой как полилактид-со-гликолид (см., например, патенты США № 4767628 и 5654008), полигликолид (ПГ), конъюгаты полиэтиленгликоля (ПЭГ) и поли(α-гидроксикислот), полиортоэфиры, полиаспирины, полифосфагены, винилпирролидон, поливиниловый спирт (PVA), PVA-g-PLGA, сополимер PEGT-PBT (полиактив), метакрилаты, поли(N-изопропилакриламид), PEO-PPO-PEO (плюроники), сополимеры PEO-PPO-PAA, PLGA-PEO-PLGA, полиортоэфиры (POE) или любые их комбинации, как описано выше (см., например, патент США № 6991454 и патент США № 20050187631, каждый из которых включен в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки), гидрогели (см., например, Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277; Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105, неразлагаемый этиленвинилацетат (например, этиленвинилацетатные диски и поли(этилен-винилацетат)), разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как Lupron Depot™, поли-D-(-)-3-гидрокси-масляная кислота (EP 133988), гели с гиалуроновой кислотой (см., например, патент США № 4636524), суспензии альгиновой кислоты, полиортоэфиры (POE) и т.п. Полилактид (PLA) и его сополимеры с гликолидом (PLGA) хорошо известны в данной области с момента коммерциализации Lupron Depot™, одобренного в 1989 году в качестве первой парентеральной композиции с замедленным высвобождением, в которой используются полимеры PLA. Дополнительные примеры продуктов, в которых используются PLA и PLGA в качестве наполнителей для достижения замедленного высвобождения активного ингредиента, включают амидокс (PLA; заболевание пародонта), депо Nutropin (PLGA; с hGH) и депо Trelstar (PLGA; рак предстательной железы). Другие синтетические полимеры включают, без ограничения, поли(с-

капролактон), поли-3-гидроксибутират, поли(β-яблочную кислоту) и поли(диоксанон)]; полиангидриды, полиуретан (см. WO 2005/013936), полиамиды, циклодекстраны, полиортоэфиры, н-виниловый спирт, полиэтиленоксид/полиэтилентерефталат, полифосфат, полифосфонат, полиортоэфир, полицианоакрилат, полиэтиленгликоль, полидигидропиран и полиацеталь. Небиоразлагаемые устройства включают, без ограничения, различные производные целлюлозы (карбоксиметилцеллюлозу, ацетат целлюлозы, ацетат пропионат целлюлозы, этилцеллюлозу, гидроксипропилметил целлюлозу), имплантаты на основе кремния (полидиметилсилоксан), акриловые полимеры, (полиметакрилат, полиметилметакрилат, полигидрокси(этилметакрилат)), а также полиэтилен-со-(винилацетат), полоксамер, поливинилпирролидон, полоксамин, полипропилен, полиамид, полиацеталь, полиэфир, поли(этилен-хлортрифторэтилен), политетрафторэтилен (ПТФЭ или «Тефлон™»), бутадиен-стирольный каучук, полиэтилен, полипропилен, полифениленоксид-полистирол, поли-а-хлор-п-ксилол, полиметилпентен, полисульфон и другие родственные биостабильные полимеры. Носители, подходящие для составов депо с замедленным высвобождением, включают, без ограничения, микросферы, пленки, капсулы, частицы, гели, покрытия, матрицы, вафли, пилюли или другие фармацевтические композиции для доставки. Примеры таких составов с замедленным высвобождением описаны выше. См. также патент США № 6,953,593; 6946146; 6656508; 6541033; и 6,451,346, содержание каждого из которых включено в настоящее описание в виде ссылки. Лекарственная форма должна быть способной нести лекарственную композицию в таких количествах и концентрациях, которые терапевтически необходимы для лечения в течение заранее выбранного периода времени, и должна обеспечивать достаточную защиту состава от разрушения под воздействием происходящих в организме процессов в течение всего периода лечения. Например, лекарственная форма может быть окружена внешней оболочкой, изготовленной из материала, который обладает защитными свойствами от разложения в результате метаболических процессов и риска, например, утечки, растрескивания, разрушения или деформации. Это может предотвратить высвобождение содержимого лекарственной формы неконтролируемым образом под воздействием стрессов, которым она может подвергаться во время использования, например, под воздействием физических сил, действующих на устройство высвобождения лекарственного вещества в результате

нормального суставного сочленения и других движений субъекта или, например, в конвективных устройствах доставки лекарственных веществ, физических сил, связанных с давлением, создаваемым в резервуаре. Резервуар для лекарственного вещества или другое средство для хранения или удержания лекарственного вещества также должно быть изготовлено из такого материала, которое позволяет избегать непреднамеренных реакций с составом активного агента, и предпочтительно должно быть биосовместимым (например, когда имплантируется лекарственная форма, состав по существу не должен быть реакцинноспособным по отношению к телу субъекта или жидкостям организма). Обычно анти-ВИЧ-1 антитела вводят индивидууму в течение по меньшей мере 12 часов, по меньшей мере недели, и, наиболее вероятно, через имплантат, предназначенный для доставки лекарственного вещества в течение по меньшей мере 10, 20, 30, 100 дней или по меньшей мере 4 месяцев, или по меньшей мере 6 месяцев, или по меньшей мере 12 месяцев, или по меньшей мере 24 месяцев, при необходимости.

В некоторых вариантах осуществления анти-ВИЧ-1 антитела или их антигенсвязывающие части по настоящему изобретению можно вводить в комбинации с одним или более дополнительными способами лечения ВИЧ-1, например, в комбинации с одним или более анти-ВИЧ агентами (например, ненуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы (NNRTI), нуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы (NRTI), ингибиторами протеаз (PI), ингибиторами слияния, антагонистами CCR5/ингибиторами проникновения, ингибиторами переноса цепи интегразы (INSTI) и их комбинации) и/или дополнительными анти-ВИЧ-1 антителами или их антигенсвязывающими частями, включая, без ограничения, дополнительные анти-ВИЧ-1 антитела или их антигенсвязывающие части по настоящему изобретению. Как показано ниже в примере 1, введение NC17, BG1 и BG18 в соотношении 1:1:1 было эффективным для уменьшения вирусной нагрузки *in vivo*. Не желая быть связанными теорией, данные указывают на то, что у донора EB354 сосуществуют моноклональные bNAb и очень низкие уровни чувствительных к нейтрализации вирусов, что наводит на предположение о том, что антитела способствуют инициации контроля у этого индивидуума. В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к пассивной вакцине или фармацевтическим композициям, содержащим по меньшей мере одно анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающие части

по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Согласно одному из вариантов осуществления вакцина или фармацевтические композиции представляют собой композицию, содержащую по меньшей мере одно антитело, описанное в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый наполнитель. Вакцина может включать множество антител, имеющих описанные в настоящей заявке характеристики, в любой комбинации и может дополнительно включать другие анти-ВИЧ-1 антитела или их антигенсвязывающие части. Пассивная вакцина может содержать один или более фармацевтически приемлемых консервантов, носителей и/или наполнителей, которые известны в данной области. В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к активной вакцине или фармацевтическим композициям, содержащим ВИЧ-1 или его антигенный фрагмент. Если используется ВИЧ-1, он может быть ослаблен. Он может быть убит нагреванием. Если используются антигенные фрагменты, может быть предпочтительным, хотя и не обязательно, использовать гликопротеин gp120, хотя также можно использовать фрагменты гликопротеина gp120.

Композиции по настоящему изобретению могут быть использованы в иммуногенной композиции для иммунизации животного. Такая иммуногенная композиция по изобретению может быть использована для приготовления вакцины. Предпочтительно изготавливают профилактическую и/или терапевтическую вакцину. Таким образом, в объем настоящего изобретения входит иммуногенная или вакцинная композиция, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель и эффективное количество антигена, как описано выше. Носители, используемые в композиции, могут быть выбраны на основе способа и пути введения и стандартной фармацевтической практики. Композиция также может содержать адъювант. Примеры адъюванта включают токсин холеры, термолабильный энтеротоксин *Escherichia coli*, липосому, неметилированную ДНК (CpG) или любой другой врожденный иммуностимулирующий комплекс. Различные адъюванты, которые можно использовать для дальнейшего усиления иммунологического ответа, зависят от вида хозяина и включают адъювант Фрейнда (полный и неполный), минеральные гели, такие как гидроксид алюминия, поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, полиолы полиуретана, полианионы, пептиды, масляные эмульсии, гемоцианин лимфы улитки и динитрофенол.

Вакцинная композиция может быть введена субъекту *per se* или

в виде фармацевтической или терапевтической композиции. Композиции по изобретению и адъювант могут быть изготовлены с помощью обычных процессов смешивания, растворения, гранулирования, изготовления драже, растирания в порошок, эмульгирования, инкапсуляции, захвата или лиофилизации. Фармацевтические композиции могут быть приготовлены обычным способом с использованием одного или более физиологически приемлемых носителей, разбавителей, наполнителей или вспомогательных веществ, которые облегчают обработку антигенов по изобретению для использования их в фармацевтически пригодных препаратах. Подходящий препарат зависит от выбранного пути введения.

Для инъекции вакцинные препараты могут быть приготовлены в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хенкса, раствор Рингера, забуференный фосфатом физиологический раствор или любой другой физиологический солевой буфер. Раствор может содержать агенты, подходящие для приготовления составов, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, композиция может быть в форме порошка, который разводят перед применением подходящим носителем, например стерильной апирогенной водой.

Количество вводимой композиции зависит, например, от конкретного антигена в композиции, от того, вводится ли адъювант вместе с антигеном, типа совместного введения адъюванта, способа и частоты введения и нужного эффекта (например, защиты или лечения), что может определить специалист в данной области. Определение эффективного количества вакцинной композиции для введения находится в пределах компетенции специалистов в данной области техники, особенно в свете подробного описания, представленного в настоящей заявке. Эффективная доза может быть первоначально оценена по результатам анализов *in vitro*. Например, доза может быть приготовлена с использованием животных моделей для достижения индукции иммунного ответа методами, хорошо известными в данной области. Специалист в данной области может легко оптимизировать введение для всех видов животных на основании результатов, описанных в настоящей заявке. Количество и интервал дозирования могут быть скорректированы индивидуально. Например, при использовании в качестве вакцины вакцинные составы по изобретению могут вводиться в количестве от 1 до 3 доз в

течение 1–36 недель. Вакцинация может продолжаться бесконечно в зависимости от обстоятельств, особенно при пассивной вакцинации. Предпочтительно вводить 1 или 2 дозы с интервалами от примерно 3 недель до примерно 4 месяцев, и после этого можно периодически проводить повторные прививки. Для отдельных животных подходящими могут оказаться альтернативные протоколы. Подходящая доза представляет собой количество вакцинной композиции, которое при введении, как описано выше, способно вызывать иммунный ответ у иммунизированного животного, достаточный для защиты животного от инфекции в течение по меньшей мере 4–12 месяцев. Как правило, количество антигена, присутствующего в дозе, варьирует от примерно 1 мкг до примерно 100 мг на кг веса хозяина, обычно от примерно 10 мкг до примерно 1 мг и предпочтительно от примерно 100 мкг до примерно 1 мкг. Подходящий диапазон доз будет варьировать в зависимости от пути введения и размера субъекта, но обычно составляет от примерно 0,1 мл до примерно 5 мл. При необходимости могут быть введены дополнительные бустерные инъекции.

D. Наборы и методы диагностики

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к наборам для обнаружения ВИЧ–1, присутствующего в образце. Эти наборы могут содержать анти–ВИЧ–1 антитело или его антигенсвязывающую часть по настоящему изобретению и различные реагенты, например, реагенты, которые помогают обнаружить связывание анти–ВИЧ–1 антитела с эпитопом, присутствующим на ВИЧ–1, например gp120 и/или gp140 или их антигенном фрагменте.

Наборы могут представлять собой анализы *in vitro*, такие как иммуноанализы, например иммуноферментные анализы (EIA), ферментный иммуносорбентный анализ (ИФА), ELISPOT (иммуноферментный спот–анализ), радиоиммуноанализы (RIA), иммунофлуоресценция и другие анализы, известные в данной области, включая, без ограничения, вестерн–блот анализ и/или методы иммунопреципитации. Анализы *in vitro* могут быть конкурентными или непрямыми, такими как сэндвич–анализ, или могут представлять собой метод захвата антител. Например, в прямом ИФА забуференный раствор антигена, например образец, содержащий ВИЧ–1 или его антигенный фрагмент, или биологический образец, содержащий или подозреваемый на наличие ВИЧ–1, добавляют в лунку планшета для микротитрования, например в 96–луночный планшет. Затем в лунку добавляют раствор не вступающего

в реакцию белка, например, бычьего сывороточного альбумина или казеина. Добавляют анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающие части, конъюгированные с ферментом, репортерной молекулой, например, конъюгированные с пероксидазой хрена, хотя не обязательно именно с этим ферментом, поскольку имеются другие широко используемые ферменты, включающие щелочную фосфатазу или β-D-галактозидазу, также возможны и другие ферменты, которые включены в объем изобретения. Затем добавляют субстрат для фермента, что приводит к появлению обнаруживаемого сигнала. Например, добавление ТМВ к пероксидазе хрена приводит к появлению окрашенного продукта, и в этом случае ИФА представляет собой колориметрический анализ. Методы ИФА могут проводиться в формате качественного или количественного анализа. Качественные результаты дают в отношении образца простой положительный или отрицательный результат (да или нет). Разрыв между положительным и отрицательным результатом определяется аналитиком и может быть статистическим. Сэндвич-ИФА обычно выполняют согласно следующему протоколу. Анти-ВИЧ-1 антитело захвата или его антигенсвязывающие части связывают (т.е. «иммобилизуют») на субстрате, например микротитровальной пластине. Затем к субстрату добавляют антиген-содержащий образец (т.е. образец, содержащий ВИЧ-1 или его антигенный фрагмент), после чего этот образец захватывается анти-ВИЧ-1 антителами. Затем субстрат промывают для удаления несвязанного антигена. Добавляют второе анти-ВИЧ-1 антитело или его антиген-связывающие части, которые связываются с другим эпитопом на ВИЧ-1, например, с другими эпитопами на gp120 или с другими антигенами, например gp140. Второе анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающие части связывают с репортерной молекулой, например ферментом, хотя репортерная молекула может быть любой молекулой, которая приводит к появлению обнаруживаемого сигнала. Планшет может быть промыт второй раз, и в тех случаях, когда репортерная молекула представляет собой фермент, может быть добавлен субстрат, например ТМВ, который приводит к появлению детектируемого сигнала (также колориметрический анализ). Третий тип общего ИФА – это конкурентный ИФА. В этих вариантах осуществления немеченое анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающие части инкубируют в присутствии антиген-содержащего образца, который затем добавляют в покрытую антигеном лунку. Планшет промывают для удаления несвязанных антител. Добавляют вторичное антитело,

которое является специфическим по отношению к первичному антителу, например, вторичное антитело, специфическое к анти-ВИЧ-1 антителам. Вторичное антитело связывают с репортерной молекулой, как описано выше, такой как фермент (или любой другой молекулой, которая может привести к появлению обнаруживаемого сигнала). В некоторых методах конкурентного ИФА используются меченые антигены, а не меченые антитела; чем меньше количество антигена в образце, тем больше меченого антигена сохраняется и тем сильнее получается обнаруживаемый сигнал.

Другие формы анализов *in vitro* включают радиоиммуноанализ (RIA). Обычно известное количество антигена связывают с радиоактивной меткой, например I-125, хотя также используются и другие метки, такие как ^{99}Tc, которое затем смешивают с известным количеством антител, специфических в отношении этого антигена, например, анти-ВИЧ-1 антителом или его антигенсвязывающими частями. Затем добавляют образец, содержащий неизвестное количество антигена (например, биологический образец, который содержит или предположительно содержит ВИЧ-1 или его антигенный фрагмент). Этот метод является прямым конкурентным методом специфического связывания; по мере увеличения концентрации немеченого антигена связывание между анти-ВИЧ-1 антителами и меченым стандартом уменьшается, что можно измерить непосредственно путем измерения радиоактивности. Известны и другие анализы, и специалист в данной области способен их использовать.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу обнаружения ВИЧ-1 или его антигенного фрагмента в образце. В таких способах можно использовать любой из описанных в настоящей заявке анализов или другие анализы, известные в данной области. Некоторые из описанных в настоящей заявке анализов обеспечивают количественное определение антигена, присутствующего в образце, и, соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам количественного определения ВИЧ-1 или его антигенных фрагментов, присутствующих в образце, например биологическом образце. Анализы, содержащие анти-ВИЧ-1 антитела или их антигенсвязывающие части по настоящему изобретению, могут или не могут быть использованы для диагностических целей. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам применения анти-ВИЧ-1 антител или их

антигенсвязывающих частей по настоящему изобретению для диагностики. Из-за специфичности анти-ВИЧ-1 антител по настоящему изобретению или их антигенсвязывающих частей иммуноанализы, содержащие анти-ВИЧ-1 антитела или их антигенсвязывающие части по настоящему изобретению, могут быть достаточными для диагностики индивидуума как имеющего активную или скрытую инфекцию ВИЧ-1. Антитела или их антигенсвязывающие части не должны ограничиваться какими-либо конкретными эпитопами, при условии, что используемые антитела или их антигенсвязывающие части являются специфическими в отношении ВИЧ-1. Например, в сэндвич-анализе первое анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающие части могут связываться с первым эпитопом, таким как gp120, и второе анти-ВИЧ-1 антитело или его антигенсвязывающие части (связанные с репортерной молекулой) могут связываться со вторым эпитопом, который может присутствовать или не присутствовать на том же антигене. Соответственно, наборы и способы, используемые для обнаружения или количественного определения ВИЧ-1 или его антигенного фрагмента, могут содержать BG18, NC37 и BG1, включая их антигенсвязывающие части, и рассматриваются в рамках настоящего изобретения, или любое из BG18, NC37 и BG1, включая их антигенсвязывающие части, и любое другое анти-ВИЧ-1 антитело, при условии, что оно пригодно для включения в такие наборы/способы. Понятно, что анти-ВИЧ-1 антитела или их антигенсвязывающие части, используемые для целей обнаружения и/или количественного определения ВИЧ-1, присутствующего в образце, или даже для диагностических целей, необязательно должны обладать нейтрализующей способностью широкого спектра действия в отношении ВИЧ-1 для возможности их применения для таких целей.

E. Эквиваленты

В тех случаях, когда указан диапазон значений, следует понимать, что в объем изобретения входит каждое промежуточное значение, с точностью до десятой доли единицы от нижнего предела, если из контекста в явном виде не следует иное, между верхним и нижним пределами этого диапазона и любым другим указанным или промежуточным значением в указанном диапазоне. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов, которые независимо могут быть включены в меньшие диапазоны, также входят в объем изобретения, с учетом любого специально исключенного

предела в указанном диапазоне. В тех случаях, когда указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие оба предела включенных пределов, также включены в объем изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такие же значения, как их обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящей заявке, также могут использоваться на практике или в испытаниях настоящего изобретения, ниже описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в настоящем описании, включены в него во всей их полноте в виде ссылки.

Используемые в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста в явном виде не следует иное.

Термин «примерно» относится к диапазону значений, которые не будут рассматриваться специалистом в данной области техники как существенно отличающиеся от базовых значений. Например, термин «примерно» может относиться к значению, которое находится в пределах 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% или 0,01% от заявленного значения, а также значению, находящемуся в пределах указанных значений.

Публикации, цитируемые в настоящей заявке, предоставлены исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящего изобретения. Ничто в данном документе не должно быть истолковано как признание того, что настоящее изобретение не дает права датировать задним числом такое раскрытие на основании более раннего изобретения. Кроме того, представленные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, что может потребовать независимого подтверждения.

Каждая из заявок и патентов, цитируемых в этом описании, а также каждый документ или справочная, патентная или непатентная литература, цитируемая в каждой из заявок и патентов (в том числе во время судебного разбирательства каждого выданного патента; «документы, цитируемые в заявке») и каждая из заявок PCT и других стран или патентов, соответствующих и/или притязающих на приоритет по отношению к любой из этих заявок и патентов, и каждый из документов, цитируемых или упоминаемых в

каждом из документов, цитируемых в заявке, настоящим в явном виде включены в настоящее описание во всей их полноте в виде ссылки. В более общем смысле документы или ссылки цитируются в настоящем описании либо в списке ссылок перед формулой изобретения; либо в самом тексте; и каждый из этих документов или ссылок («ссылок, цитируемых в настоящем документе»), а также каждый документ или ссылка, цитируемая в каждой из ссылок, цитируемых в настоящем документе (включая спецификации, инструкции и т.д. любого производителя), настоящим в явном виде включена в настоящий документ в виде ссылки.

Приведенные ниже неограничивающие примеры служат для дополнительной иллюстрации настоящего изобретения.

VII. ПРИМЕРЫ

1. Сосуществование эффективных нейтрализующих анти-ВИЧ-1 антител широкого спектра действия и чувствительных к антителам вирусов в контроллере виремии

А. Методы

ВИЧ-1-инфицированный субъект EB354

Очищенный IgG от донора EB354 попал в 1% лучших по широте и эффективности нейтрализации в когорте из 394 инфицированных ВИЧ-1 долгосрочных непрогрессоров. Донору EB354 был поставлен диагноз ВИЧ-1 группы B в 1986 году. Он получал лечение диданозином и ставудином в период с 1995 по 1998 год, но с тех пор не получал антиретровирусной терапии. Он находится на плановом наблюдении врача с 2002 (Таблица 3: HLA A*01:01, 24:02, B*27:05, 57:01, C*01:02, 06:02). В организме большинства индивидуумов быстро вырабатываются специфические к штамму антитела вскоре после заражения. Этот ответ связан с отбором устойчивых вирусных вариантов, которые в некоторых случаях вызывают образование bNAb. Тем не менее, индивидуумы, прошедшие детальное обследование, отличаются от EB354 тем, что развитие bNAb связано с быстрым отбором аутологичных вирусов в плазме, устойчивых к сосуществующим bNAb. EB354 важен, потому что чувствительные и устойчивые вирусные штаммы сосуществуют с bNAb, а резистентные штаммы не способны вызывать высокие уровни виремии либо потому, что они в некотором роде частично эффективны, либо контролируются CD8+ T-клетками. Таким образом, в организме этого индивидуума чувствительные к bNAb вирусы плазмы оказались неспособны ускользнуть от иммунного давления, что привело к равновесию bNAb:вирус, при котором вирус

сохраняется, но не способен вызывать высокие уровни виремии. EB354 является необычным тем, что он является как элитным контроллером, так и элитным нейтрализатором. Элитные контролеры ВИЧ-1 – это инфицированные индивидуумы, в организме которых поддерживается низкая вирусная нагрузка в течение многих лет. Эти индивидуумы гораздо реже передают вирус и демонстрируют долгосрочную выживаемость без СПИДа. Аллели HLA B57*01 и/или B27*05 обнаружены у 85% элитных контроллеров ВИЧ-1. Эти аллели связаны с повышенной цитотоксической активностью CD8 Т-клеток. По сравнению с виремическими прогрессорами (т.е., пациентами с высокой вирусной нагрузкой), у элитных контролеров вероятность развития bNAb меньше. Независимо от устойчивых ответов CD8+ Т-клеток, которые способны частично контролировать инфекцию, уровень репликации ВИЧ-1 у EB354 был достаточным для генерации bNAb и созревания аффинности. Как обсуждалось в настоящем описании, bNAb, которые обеспечивают в организме донора EB354 серологическую нейтрализующую активность, распознают несколько непересекающихся эпитопов.

Дата постановки диагноза	1986		
HLA	A101,2402	B2705,5701	Cw102,602
Дата визита	**Вирусная нагрузка**	**CD4abs**	**CD8abs**
4/24/2002	310	957	1406
8/7/2002	653	554	
12/3/2002	2520	983	1787
3/11/2004	1035	1323	1634
6/18/2004	171	1231	1753
8/20/2004	467		
10/7/2004	182	789	
2/28/2005	1048	1227	
8/25/2005	< 400	1080	
11/17/2005	1665	1551	
8/3/2006	< 400		
10/24/2006	< 400	744	1132
11/15/2006	206	814	

4/6/2007	< 400	564	
11/28/2007	< 400	781	
7/17/2008	149	815	
3/17/2009	107	734	
2/19/2010	170	900	1933
8/10/2010	65	1096	1706
7/13/2011	380	795	1512
3/28/2013	414	1127	1809
9/18/2013	547	674	1152
7/21/2014	454	697	1321
7/17/2015	461	605	1224

Таблица 3. Клинические показатели донора EB354

Сортировка B-клеток и выделение антител

Сортировку единичных приманка+CD19+IgG+B-клеток из PBMC донора EB354 выполняли, как описано у J. F. Scheid et al., A method for identification of HIV gp140 binding memory B cells in human blood. Journal of immunological methods 343, 65-67 (2009). B-клетки памяти предварительно обогащали анти-CD19 магнитными частицами (MACS) и окрашивали с использованием четырех различных приманок: корового белка 2CC gp120 в качестве приманки, $gp140_{YU2}$, 1:1 смесь $gp140_{92UG37.8}$ (тип A) + $gp140_{CZA79012}$ (тип B) и BG505 SOSIP.664. Резервные (rescue) праймеры использовали для амплификации как тяжелых цепей, так и генов Igλ, а обычные праймеры использовали для цепи IgK. Все продукты ПЦР секвенировали и анализировали на предмет использования гена Ig, CDR3 и количества соматических гипермутаций V_H/V_L (IgBLAST и IMGT). Очищенные, расщепленные продукты ПЦР клонировали в векторы экспрессии человеческого Igγ1, Igк или Igλ, как описано у T. Tiller et al., Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. Journal of immunological methods 329, 112-124 (2008), и продуцировали путем временной трансфекции плазмид экспрессии IgH, IgK и IgL в экспоненциально растущие клетки HEK 293-6E, как описано у F. Klein et al., Enhanced HIV-1 immunotherapy by commonly arising antibodies that target virus escape variants. The Journal of experimental medicine 211, 2361-2372 (2014).

Изучение нейтрализации

Нейтрализацию ВИЧ-1 оценивали, используя анализ клеток TZM.bl на основе активности люциферазы. Вкратце, псевдовирусы оболочки инкубировали с пятикратными серийными разведениями отдельных антител и наносили на клетки TZM.bl, которые несли репортерный ген люциферазы. Через 48 часов клетки лизировали и измеряли люминесценцию. Значения IC_{50} и IC_{80} отражают концентрации отдельных антител, которые вызывают снижение люминесценции в относительных единицах (RLU) на 50% и 80%, соответственно. Кривые спектра активности строили с помощью вычислительного инструмента Antibody Database.

Кристаллизация, сбор данных рентгеновского анализа и определение структуры

Кристаллы Fab BG18 с удаленным путем мутации Asn26HC в Gln потенциальным N-связанным сайтом гликозилирования в положении 26 тяжелой цепи продемонстрировали превосходный размер и морфологию по сравнению с кристаллами Fab BG18 дикого типа, таким образом, было выполнено определение структуры с использованием Fab $BG18_{N26Q}$. Кристаллы Fab $BG18_{N26Q}$ (пространственная группа $P2_1$; a=46,12 Å, b=71,04 Å, c=69,54 Å; β=98,48°; 1 молекула на асимметричную единицу); получали путем объединения 0,2 мкл раствора белка с концентрацией 18 мг/мл с 0,2 мл 0,1 М ацетата натрия, pH 4,5, 26,8% (об./об.) полиэтиленгликоля (ПЭГ) 400 и 13,4% (об./об.) ПЭГ 8000 при 20°C, обеспечивали криозащиту в маточном растворе, дополненном 20% (об./об.) этиленгликолем, и мгновенно охлаждали в жидком азоте. Кристаллы Fab NC102 (пространственная группа $P2_12_12_1$; a=60,2 Å, b=82,5 Å, c=117,2 Å; 1 молекула на асимметричную единицу) получали путем диффузии в паровой фазе в сидячих каплях с резервуаром 0,1 М тригидрата ацетата натрия, pH 4,6, и 2,0 М сульфата аммония с использованием 250 нл капель с соотношением белок:резервуар 1,5:1. Кристаллам обеспечивали криозащиту в маточном растворе, дополненном 25% (об./об.) этиленгликоля, и мгновенно охлаждали в жидком азоте. Кристаллы комплекса NC37-93TH057 (пространственная группа $P2_12_12_1$; a=63,6 Å, b=67,4 Å, c=210,4 Å; 1 комплекс на асимметричную единицу) получали диффузией в паровой фазе в 250 нл сидячих каплях путем инкубации белка и резервуара (включающего 0,1 М HEPES, pH 7,5 и 20% (мас./об.) ПЭГ 10000) при соотношении белок:резервуар 1,5:1. Кристаллам обеспечивали криозащиту в маточном растворе, дополненном 20% (мас./об.) ПЭГ 400, и мгновенно охлаждали в жидком азоте.

Данные рентгеновской дифракции собирали на линии 12-2 луча источника синхротронного излучения Стэнфорда, оснащенного пиксельным детектором Pilatus 6M (Dectris). XDS использовали для индексации, интеграции и масштабирования данных. Кристаллы Fab $BG18_{N26Q}$ дифрагировали до 1,5 Å, и определяли структуру путем молекулярной замены, используя в качестве моделей исследования V_HV_L 10-1074 Fab (PDB код 4FQ2) с удаленными петлями CDR и C_H1C_L. Структуру уточняли, используя итеративный подход с помощью программы Phenix и построения моделей вручную в графической программе Coot. Конечная модель Fab $BG18_{N26Q}$ (R_{work}=18,0%, R_{free}=18,9%) содержала 98,3%, 1,7% и 0% остатков в предпочтительном, разрешенном и запрещенном областях участка Рамачандрана, соответственно. Fab NC102 дифрагировали до 1,6 Å, и структуру определяли путем молекулярной замены, используя в качестве моделей исследования модель NIH45-46 (код PDB 3U7W) с V_HV_L с удаленными петлями CDR и C_H1C_L. Окончательная модель Fab NC102 (R_{work}=18,0%, R_{free}=20,0%) содержала 98%, 2% и 0% остатков в предпочтительных, разрешенных и запрещенных областях участка Рамачандрана, соответственно. Структуру комплекса NC37-93TH057 gp120 получали путем молекулярной замены, используя в качестве моделей исследования модели V_HV_L, C_H1C_L NC102 и усеченного кора gp120 (из PDB 3U7Y). Конечная модель комплекса NC37-93TH057 (R_{work}=21,0%, R_{free}=26,0%) содержала 96%, 4% и 0% остатков в предпочтительном, разрешенном и запрещенном областях участка Рамачандрана, соответственно. Результаты статистики по сбору данных и уточнению представлены в таблице 4.

	354BG18 Fab	**354NC37+93TH057**	**354NC102 Fab**
Диапазон разрешения (Å)	35,44-1,3 (1,346-1,3)	38,6-2,7 (2,82,7)	38,91-1,60 (1,66-1,60)
Пространственная группа	$P2_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Параметры элементарной ячейки			
a, b, c (Å)	46,12, 71,04, 69,54	63,60, 67,41, 210,42	60,22, 82,50, 117,21

a, b, g (°)	90, 98,48, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Измерено отражений	634239 (60770)	172153 (17052)	515918 (48175)
Независимые отражения	106792 (10428)	25596 (2517)	77546 (7649)
Кратность	5,9 (5,7)	6,7 (6,8)	6,7 (6,3)
Полнота (%)	0,98 (0,98)	1,00 (1,00)	1,00 (1,00)
Значение I/сигма (I)	14,48 (0,86)	14,80 (2,73)	11,12 (1,68)
B-фактор Вильсонв (Å^2)	14,92	41,63	15,84
R-merge	0,06152 (1,772)	0,1272 (0,7028)	0,108 (1,031)
CC1/2	0,999 (0,318)	0,996 (0,832)	0,997 (0,996)
CC*	1 (0,694)	0,999 (0,953)	
R_{work}	0,180	0,21	0,18
R_{free}	0,189	0,26	0,2
Количество атомов	3616	6161	4159
макромолекул	3167	5924	3402
лигандов		235	25
растворителя	449	2	732
Остатов белка	432	781	448
RMS (связи) (Å)	0,009	0,005	0,007
RMS (углы) (°)	1	0,96	1,145
Clashscore (индекс перекрывания)	6,17	13,99	3,41
Среднее значение B-фактора (Å^2)	22,89	36,55	20,37
макромолекул	21,3	35,77	17,77
лигандов		56,03	34,45
растворителя	34,17	34,8	31,96

Таблица 4. Результаты статистики по сбору данных и уточнению статистики. Статистические данные для оболочки с самым высоким разрешением приведены в скобках.

Структуру комплекса BG505 SOSIP.664-BG18-179NC75 получали с помощью криоэлектронной томографии/усреднения субтомограмм до ~40 Å и использовали в качестве эталонной структуры для получения ЭМ структуры единичной частицы из негативно окрашенных образцов. Очищенные комплексы BG505 SOSIP.664-BG18-179NC75 разбавляли до концентрации 10 мкг/мл в TBS непосредственно перед добавлением 3 мкл к иммерсионной ультратонкой пленке C на перфорированной углеродной пленке-подложке, 400 меш, Cu-сетки (Ted Pella, Inc.). Образцы на сетках сшивали с использованием паров глутаральдегида и затем окрашивали 3% уранилацетатом. Данные собирали с помощью просвечивающего электронного микроскопа FEI Tecnai T12, работающего при 120 кэВ, снабженного камерой Gatan Ultrascan 2k×2k CCD. Изображения получали с временной выдержкой 0,5 секунды при номинальном увеличении 42000x при расфокусировке 1 мкм, с разрешением 2,5 Å на пиксель. Методом роя частиц, используя программу EMAN2.1, в общей сложности было отобрано 25 639 частиц, и коррекцию CTF выполняли с помощью программы EMAN2.1. Начальное усреднение по 2D классам, без эталона, выполняли с помощью программы RELION, и все частицы были отсортированы по 250 классам. Было отобрано 9 827 частиц с хорошими средними показателями класса, и частицы были дополнительно отсортированы по 3D классификации с помощью программы RELION, после чего для уточнения было отобрано 7 925 частиц. Для получения эталонной структуры для 3D классификации и уточнения собирали данные из независимого образца комплекса BG505 SOSIP.664-BG18-179NC75 с помощью криоэлектронной томографии, и структуру, полученную по усредненным 40 Å субтомограммам, получали методом, описанным у Scharf, L., et al., Broadly Neutralizing Antibody 8ANC195 Recognizes Closed and Open States of HIV-1 Env. Cell, 2015. 162(6):p. 1379-90. Структуру, усредненную по субтомограммам, фильтровали с помощью фильтра нижних частот до 80 Å для использования в качестве эталонной структуры для реконструкции единичных частиц. Разрешение окончательной реконструкции единичных частицы составляло ~25 Å, рассчитанное с помощью программы RELION и золотого стандарта FSC с отсечкой 0,143, рекомендованных для оценки разрешения для ЭМ-реконструкций единичных частиц.

Подгонка к карте ЭМ плотности

ЭМ структуры визуализировали с помощью программы USCF Chimera. Координаты из кристаллических структур вписывли в усредненные по субтомограмме или негативно окрашенные ЭМ-структуры единичных частиц, используя 'Fit in map' утилиту в программе UCSF Chimera со следующими параметрами: корреляция в реальном времени/обновление среднего значения, использовать карту, смоделированную из атомов, разрешение 25 Å. Сначала в плотность вписывали структуру BG505 SOSIP.664 (PDB 4TVP), а затем координаты для Fab BG18 и Fab CH103 (PDB 4JAM; в качестве модели для Fab 179NC75) отдельно в соответствующие плотности. Области доменов C_H1–C_L Fab имели низкую плотность.

Продуцирование и очистка белка для исследований по определению структуры

6x-His-меченные Fab BG18, $BG18_{N26Q}$, NC102 и NC37 экспрессировали путем временной трансфекции в клетках HEK293-6E и очищали от супернатантов трансфицированных клеток с помощью Ni^{2+}-NTA аффинной хроматографии (GE Healthcare) и эксклюзионной хроматографии на Superdex 200 размером 16/60 (SEC) (GE Healthcare). Усеченный, His-меченный, коровый белок 93TH057 gp120 продуцировали в инфицированных бакуловирусом клетках насекомых и очищали, как описано, с помощью Ni^{2+} аффинной хроматографии (GE Healthcare) (Diskin et al. Science 2011; Diskin et al. NSMB 2010). Перед испытаниями на кристаллизацию очищенные белки NC37 и 93TH057 совместно инкубировали (при 2:1 молярному отношению Fab к кору gp120) и обрабатывали 5 кЕ эндогликозидазы H на мг белка gp120 в течение 3 часов при 25°C. Комплекс, обработанный эндогликозидазой H, очищали с помощью эксклюзионной хроматографии по размеру на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare).

Растворимые тримеры BG505 SOSIP.664 для ЭМ исследований конструировали, как описано у Sanders, R.W., et al., A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies. PLoS Pathog, 2013. 9(9):p. e1003618. Клетки HEK293-6E, обработанные 5 мкМ кифунензина (Sigma), ко-трансфицировали плазмидами, кодирующими BG505 SOSIP.664 и растворимый фурин в соотношении 4:1. Белок BG505 SOSIP.664 собирали из супернатантов клеток, используя иммуноаффинную колонку 2G12, приготовленную путем ковалентного

связывания мономера IgG 2G12 с колонкой с NHS-активированной сефарозой (GE Healthcare). Белок элюировали 3М $MgCl_2$ с последующей немедленной заменой буфера трис-буферным солевым раствором (TBS), pH 7,4 (50 мМ NaCl). Тримеры дополнительно очищали на колонке Mono Q 5/50 GL (GE Healthcare), а затем на колонке Superose 6 10/300 SEC (GE Healthcare).

Аутологичные вирусы

Для одногеномного секвенирования (SGS) генов env ВИЧ-1 ВИЧ-1-РНК экстрагировали из плазмы пациента с помощью набора Qiagen MinElute Virus Spin Kit в соответствии с инструкциями производителя. Экстрагированную РНК подвергали синтезу Env-специфической кДНК с помощью обратной транскриптазы SuperScript III, используя ВИЧ-1-специфический праймер envB3out:

envB5out: 5′-TAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAG-3′ (SEQ ID NO: 97)

envB3out: 5′-TTGCTACTTGTGATTGCTCCATGT-3′ (SEQ ID NO: 98)

envB5in: 5′-TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG-3′ (SEQ ID NO: 99)

envB3in: 5′-GTCTCGAGATACTGCTCCCACCC-3′ (SEQ ID NO: 100).

Первый цикл ПЦР проводили в объеме 20 мкл, содержащем 1x High Fidelity буфер, 2 мМ $MgSO_4$, 0,2 мМ dNTP и 0,5 ед. High Fidelity Platinum Taq и по 0,2 мкМ каждого из праймеров envB5out и envB3out. Второй цикл ПЦР проводили, используя 1 мкл ПЦР 1 и 0,2 мкМ праймеров envB5in и envB3in. Условия ПЦР были такими же, как для ПЦР-1, за исключением 45 циклов и повышенной температуры отжига, равной 58°C. Продукты ПЦР-2 проверяли с помощью 1% 96-луночных E-гелей (Invitrogen). Из полос, полученных в результате ПЦР с эффективностью амплификации менее 30%, получали библиотеки, которые секвенировали с помощью набора Nextera DNA Sample Preparation Kit (Illumina). Экспрессионные кассеты CMV-Env генерировали в соответствии с протоколом, описанным у J. L. Kirchherr et al., High throughput functional analysis of HIV-1 env genes without cloning. J Virol Methods 143, 104-111 (2007). 500 нг CMV-env трансфицировали совместно с pSG3Δenv в 6-луночных планшетах в клетки 293T, и через 48 часов собирали супернатант. Все последовательности плазмид проверяли перед экспрессией. Супернатанты тестировали на нейтрализацию с помощью TZM-bl анализа.

TZM-bl анализы гликоль-мутантных вирусов Env

Псевдовирусы получали путем трансфекции клеток 293T (ATCC) плазмидой, экспрессирующей Env ВИЧ-1, и плазмидой геномного остова, дефицитного по Env, названной pSG3ΔEnv, как описано у

Li, M., et al., Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. J Virol, 2005. 79(16):p. 10108-25. Псевдовирусы собирали через 72 часа после трансфекции для использования в анализах нейтрализации. Нейтрализующую активность оценивали в одном цикле анализа репликации псевдовируса и клеток-мишеней TZM-Bl, как описано у Li et al. выше. Вкратце, клетки TZM-bl высевали в плоскодонный 96-луночный планшет. К этому планшету добавляли псевдовирус, который предварительно инкубировали с серийными разведениями антител в течение 1 часа при 37°C. Через 72 часа после заражения выполняли количественное определение экспрессии репортерного гена люциферазы после лизиса и добавления субстрата для люциферазы Bright-Glo™ (Promega). Для определения значений IC_{50} получали кривые доза-ответ методом нелинейной регрессии.

Синтез гликопептидов V3 ВИЧ-1

Гликопептиды V3, полученные из нескольких штаммов ВИЧ-1, синтезировали с использованием хемоферментного метода, который состоит из автоматизированного твердофазного пептидного синтеза предшественника GlcNAc-пептид и последующего ферментативного трансгликозилирования GlcNAc-пептида для получения целевых гликопептидов, следуя процедурам, описанным у Amin, M.N., et al., Synthetic glycopeptides reveal the glycan specificity of HIV-neutralizing antibodies. Nat Chem Biol, 2013. 9(8):p. 521-6. Взаимодействия между биотинилированными синтетическими гликопептидами и антителами IgG BG18 и BG8 оценивали методом SPR с помощью системы BIAcore T200 (GE Healthcare) при 25°C. Биотинилированные гликопептиды иммобилизовали на сенсорных чипах CM5, покрытых нейтравидином, в буфере HBS-P (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, поверхностно-активное вещество P20 0,05% об./об., pH 7,4) до достижения ответа 200 единиц (RU). BG18 (или BG8) инъецировали при двукратном серийном разведении концентрации, начиная с 4 мкМ, в буфере BS-P со скоростью потока 40 мкл/мин в течение 180 с. Затем в течение 1210 с вводили буфер BS-P со скоростью потока 40 мкл/мин для обеспечения диссоциации. Регенерацию проводили путем введения 3 М $MgCl_2$ со скоростью потока 50 мкл/мин в течение 3 минут с последующей инъекцией буфера HBS-P со скоростью потока 50 мкл/мин в течение 5 мин.

***In vivo* мышиная модель**

Гуманизированным мышам NOD $Rag1^{-/-}Il2rg^{null}$ (NOD.Cg-$Rag1^{tm1Mom}$

Il2rgtm^{1Wjl}/SzJ) (The Jackson Laboratory) вводили подкожно (s.c.) 1 мг каждого антитела два раза в неделю в течение 3 недель, общим количеством инъекций антител, равным шести. Контрольных hu-мышей создавали, используя человеческие клетки от того же донора, и инфицировали ВИЧ-1YU2, но не вводили антитела. Нагрузку плазмы вирусами измеряли еженедельно. Последовательности gp120 от мышей с увеличенной вирусной нагрузкой получали, как описано в in F. Klein et al., HIV therapy by a combination of broadly neutralizing antibodies in humanized mice. Nature 492, 118-122 (2012).

Методы ИФА

96-луночные планшеты для ИФА с высокой степенью связывания (Costar) покрывали в течение ночи 5 мкг/мл очищенного кора 2CC, складчатого тримера gp120.YU2 (дикого типа или мутантов) или gp140.YU2 в PBS. После 6 разовой промывки PBS+0,05% Твин 20 планшеты блокировали в течение 2 часов 2% BSA, 1 мкМ EDTA и 0,05% Твин-PBS («блокирующий буфер»), а затем инкубировали в течение 1 часа с IgG, которые добавляли в виде семи последовательных разведений 1:4 в PBS с начальной концентрацией 4 мкг/мл. После дополнительной промывки планшеты окрашивали путем инкубации с козьим HRP-конъюгированным антителом против человеческого IgG (Jackson ImmunoResearch) (при 0,8 мкг/мл в блокирующем буфере) в течение 1 часа с последующим добавлением хромогенного субстрата пероксидазы хрена (HRP) (раствор ABTS); Invitrogen). Для конкурентного ИФА планшеты покрывали 0,5 мкг/мл BG505.SOSIP.664, промывали, блокировали в течение 2 часов блокирующим буфером и затем инкубировали в течение 1 часа с добавленными IgG в виде семи последовательных разведений 1:4 в PBS с начальной концентрацией 32 мкг/мл в присутствии биотинилированного антитела с постоянной концентрацией 4 мкг/мл. Затем планшеты окрашивали, используя HRP-конъюгированный стрептавидин (Jackson ImmunoReseach) (с концентрацией 1 мкг/мл в блокирующем буфере).

Для ИФА с использованием тримеров BG505 SOSIP.664 с меткой эпитопа D7324 (BG505 SOSIP.664-D7324) планшеты покрывали в течение ночи 5 мкг/мл антитела D7324, как описано у Sanders, R.W., et al., A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies. PLoS Pathog, 2013. 9(9):p. e1003618, и затем промывали и инкубировали

с 500 нг/мл тримера. После дополнительной промывки добавляли IgG в течение 1 часа в виде семи последовательных разведений 1:4 в PBS с исходной концентрацией 4 мкг/мл. Конечный продукт получали путем инкубации с козьими HRP-конъюгированными антителами против человеческого IgG, как описано выше. Все эксперименты выполняли не менее 3 раз.

Генерация вирусов CMV-Env

Экспрессионные кассеты CMV-env генерировали в соответствии с установленным протоколом (52). Вкратце, промотор CMV амплифицировали из экспрессионного вектора pcDNA 3.1D/V5-His-TOPO с помощью следующих праймеров:

CMVenv: 5′-AGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT-3′ (SEQ ID NO: 101) and

CMVenv1A 5′-CATAGGAGATGCCTAAGCCGGTGGAGCTCTGCTTATATAGACCTC-3′ (SEQ ID NO: 102).

Продукт ПЦР очищали, используя набор для ПЦР Macherey-Nagel и гель-очиститель. 1 мкл продукта первого цикла ПЦР амплифицировали с использованием следующих праймеров:

env1ATOPO 5′-CACCGGCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA - 3 ′(SEQ ID NO: 103) иRev19 5′-ACTTTTTGACCACTTGCCACCCAT-3 ′(SEQ ID NO: 104) в объеме 20 мкл, содержащем 1x High Fidelity буфер, 2 мМ $MgSO_4$, 0,2 мМ dNTP, 0,5 ед. High Fidelity Platinum Taq и 0,2 мкМ каждого праймера. Условия цикла были следующими: 94°C, 2 мин; (94°C, 15 с; 55°C, 30 с; 68°C, 4 мин) x 35; 68°C, 10 мин. Присутствие env подтверждали анализом на 0,7% агарозном геле, и продукт очищали с помощью набора для очистки Macherey-Nagel Gel и ПЦР. Затем 10 нг оболочки и 0,5 нг CMV подвергали ПЦР с перекрыванием, используя праймеры CMVenv и Rev19, в трех экземплярах. Общий реакционный объем 6 составлял 50 мкл, содержащий 1x High Fidelity буфер, 0,2 мкМ $MgSO_4$, 0,2 мМ dNTP, 1 ед. High Fidelity Platinum Taq и 0,4 мкМ каждого праймера. ПЦР проводили при 94°C, 2 мин; (94°C, 30 с; 60°C, 30 с; 68°C, 4 мин) x 25; 68°C, 10 мин. 500 нг CMV-env трансфицировали совместно с pSG3Δenv в 6-луночных планшетах в клетки 293T, и через 48 часов собирали супернатант. Супернатанты тестировали на нейтрализацию с помощью TZM-bl анализа, как описано выше.

Культура Вируса (VOA)

Вирус из донора EB354 получали путем совместного культивирования мононуклеарных клеток периферической крови пациента (PBMC) со здоровыми донорскими PBMC, как описано у

van't Wout et al., Isolation and propagation of HIV-1 on peripheral blood mononuclear cells. Nat Protoc, 2008. 3(3):p. 363-70. Здоровые донорские PBMC получали от пациентов с помощью лейкафереза согласно протоколу исследования MNU-0628 университете Рокфеллера. Здоровые донорские PBMC предварительно стимулировали при плотности 5×10^6 клеток на мл в IMDM, содержащей 10% FBS, 1% пенициллин-стрептомицин и 1 мкг/мл PHA, в течение 2-3 дней при 37°C при 5% CO_2. Затем 6×10^6 стимулированных донорских PBMC переносили в IMDM, содержащую 10% FBS, 1% пенициллин-стрептомицин, 10 МЕ/мл IL-2 и 5 мкг/мл полибрена, и совместно культивировали с $5-10\times10^6$ PBMC EB354 при 37°C и 5% CO_2. Среду меняли еженедельно, и наличие p24 в культуральном супернатанте определяли количественно с помощью набора Lenti-X p24 Rapid Titer (Clontech). Культуры с содержанием p24 более 1 нг на мл супернатанта замораживали и хранили при -80°C. Определение инфекционной дозы 50 для культуры ткани ($TCID_{50}$) и последующее тестирование чувствительности аутологичных вирусов к различным нейтрализующим антителам широкого спектра действия и аутологичному сывороточному IgG выполняли с помощью TZM-bl анализа нейтрализации в соответствии с протоколами, описанными выше. Все анализы нейтрализации проводили в двух экземплярах.

Мутанты оболочки ВИЧ-1_{YU2}

Одиночные, двойные и тройные мутации вводили в оболочку ВИЧ-1_{YU2} дикого типа с помощью набора для множественного сайт-направленного мутагенеза QuikChange в соответствии со спецификациями производителя (Agilent Technologies).

Анализ эволюции вируса

Выравнивания нуклеотидных последовательностей env осуществляли с помощью программы ClustalW (версия 2.11) или путем ручного выравнивания с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей Geneious (версия 8.1.6). Для филогенетического анализа и вычисления разнообразия области, которые не могли быть однозначно выровнены, удаляли. Эволюционные модельные классы для филогенетического анализа методом максимального правдоподобия выбирали с помощью программы jModelTest. Методом максимального правдоподобия получали филогенетические деревья с помощью программы PhyML (версия 3) с совместной оценкой значений параметров модели и филогении. Выполняли попарное сравнение генетического разнообразия между выборками с помощью статистического теста U из двух выборок в

веб-инструменте DIVEIN.

Биоинформатическая обработка последовательностей enV с помощью системы MiSeq

Адаптеры последовательностей удаляли с помощью программы Cutadapt v1.8.3. Считывание сборки для каждого вируса выполняли в три этапа. Сначала, сборку *de novo* выполняли с помощью программы Spades v3.6.1 с получением длинных файлов contig. Затем contig длиной более 255 п.н. выравнивали относительно эталонной последовательности оболочки ВИЧ, и создавали консенсусную последовательность с помощью программы Geneious 8. Наконец, считывания повторно выравнивали относительно консенсусной последовательности, чтобы закрыть гэпы, и получали окончательный консенсус. Последовательности с двойными пиками (идентичность консенсуса с отсечкой для любого остатка <75%) исключали из последующего анализа.

Статистический анализ

Статистические различия анализировали с помощью теста Манна-Уитни. Для анализа использовали программное обеспечение GraphPad Prism, и данные считались значимыми при *$p \leq 0,05$, **$p \leq 0,01$ и ***$p \leq 0,001$.

В. Результаты

Несколько BNAb

Очищенный IgG из образца донора EB354 попал в 1% лучших по широте и эффективности нейтрализации в когорте из 394 инфицированных ВИЧ-1 долгосрочных непрогрессоров. Этому донору был поставлен диагноз ВИЧ-1 типа B в 1986 году. EB354 получал лечение диданозином и ставудином в период с 1995 по 1998 год, но с тех пор не получал антиретровирусной терапии. В 2002 году вирусная нагрузка у EB354 составляла <400 копий/мл, а количество CD4 и CD8 составляло 954 и 1046 клеток/мм^3, соответственно. В период с 2002 по 2006 г. у EB354 было три задокументированных пика виремии (фиг. 1A). Серологическую нейтрализующую активность и широту спектра действия впервые оценили в 2006 году, когда вирусная нагрузка составляла <400 копий/мл (фиг.1A и 1B и таблица 3). Нейтрализующая активность увеличивалась до 2010 года и оставалась широкой и мощной с того времени (фиг. 1B). HLA-типирование выявило HLA A*01:01, 24:02, B*27:05, 57:01, C*01:02, 06:02 (таблица 3).

Для выделения антител, которые отвечают за серологическую активность у этого субъекта, выполнили отбор отдельных клеток,

используя четыре разные приманки ВИЧ-1; кор 2CC, $gp140_{YU2}$, 1:1 смесь $gp140_{92UG37.8}$ (тип A) + $gp140_{CZA79012}$ (тип C) и BG505 SOSIP.664 (фиг. 1C). Общее количество выделенных спаренных тяжелых и легких цепей составило 241, из которых 152 антитела образовали 22 различных клона. Антитела из 3 клонов показали нейтрализующую активность уровня 2 (фиг. 1C и таблица 13). По сравнению с сывороточным IgG в период 2010-2015 гг. антитела, принадлежащие этому клону, примером которого является антитело BG18 (фигура 1C), обеспечивали наибольшую часть серологической активности (фигура 1D). Антитела, принадлежащие двум другим нейтрализующим клонам, примером которых являются антитело NC37 и антитело BG1 (фигура 1C), были менее эффективными, но дополняли активность BG18 (фигура 1D).

Для картирования сайтов связывания антител в 3 нейтрализующих клонах проводили TZM-bl анализы, используя варианты $HIV\text{-}1_{YU2}$, несущие в Env эпитоп-специфические точечные мутации. Учитывая тот факт, что поликлональный IgG не показал поддающегося измерению изменения чувствительности к мутантам, антитело BG18 оказалось чувствительным к $YU2_{N332K}$ (гликан-V3), антитело BG1 - к $YU2_{N160K}$ (V1V2) и антитело NC37 - к $YU2_{N280Y}$ (CD4b) (фиг. 1D). Согласно результатам нейтрализации, связывание BG18 в методе ИФА конкурентно ингибировалось PGT121 и 10-1074; а связывание BG1 уменьшалось в присутствии PGT145 (фиг.5).

BG18 нейтрализовал 64% вирусов на панели из 118 вирусов (фиг. 1E, таблица 5) со средним геометрическим значением IC_{50} 0,03 мкг/мл и по широте спектра действия был сопоставим, но более эффективным, чем PGT121 или 10-1074 (фиг. 1F, таблицы 5-10). Антитела NC37 и BG1 имели средние геометрические значения IC_{50}, равные 0,3 мкг/мл и 0,67 мкг/мл, и широту 33% и 37%, соответственно. (Фиг. 1E и 1F, таблицы 6 и 7). Смесь 1:1:1 трех bNAb нейтрализовала 81% вирусов на панели из 118 вирусов со средним геометрическим значением IC_{50}, равным 0,130 мкг/мл, что указывает на аддитивный эффект (фиг. 1E, таблица 11).

BG18			
ID вируса	**Группа**	**IC_{50}**	**IC_{80}**
6535.3	B	0,001	0,005
QH0692.42	B	0,013	0,042
SC422661.8	B	0,005	0,021
PVO.4	B	0,003	0,013

TRO.11	B	0,001	0,002
AC10.0.29	B	0,001	0,003
RHPA4259.7	B	1,437	>30
THRO4156.18	B	>30	>30
REJO4541.67	B	>30	>30
TRJO4551.58	B	3,341	26,938
WITO4160.33	B	0,018	0,250
CAAN5342.A2	B	0,008	0,040
WEAU_d15_410_787	B (T/F)	0,003	0,012
1006_11_C3_1601	B (T/F)	0,001	0,004
1054_07_TC4_1499	B (T/F)	0,005	0,022
1056_10_TA11_1826	B (T/F)	0,007	0,045
1012_11_TC21_3257	B (T/F)	0,003	0,012
6240_08_TA5_4622	B (T/F)	0,003	0,010
6244_13_B5_4576	B (T/F)	0,011	0,049
62357_14_D3_4589	B (T/F)	3,008	>30
SC05_8C11_2344	B (T/F)	0,003	0,016
Du156.12	C	0,003	0,010
Du172.17	C	>30	>30
Du422.1	C	0,009	0,057
ZM197M.PB7	C	>30	>30
ZM214M.PL15	C	>30	>30
ZM233M.PB6	C	2,866	29,805
ZM249M.PL1	C	>30	>30
ZM53M.PB12	C	>30	>30
ZM109F.PB4	C	>30	>30
ZM135M.PL10a	C	0,029	0,161
CAP45.2.00.G3	C	>30	>30
CAP210.2.00.E8	C	3,469	10,748
HIV-001428-2.42	C	0,004	0,021
HIV-0013095-2.11	C	10,516	29,966
HIV-16055-2.3	C	>30	>30
HIV-16845-2.22	C	0,019	0,090

Ce1086_B2	C (T/F)	>30	>30
Ce0393_C3	C (T/F)	>30	>30
Ce1176_A3	C (T/F)	0,004	0,012
Ce2010_F5	C (T/F)	>30	>30
Ce0682_E4	C (T/F)	>30	>30
Ce1172_H1	C (T/F)	0,002	0,007
Ce2060_G9	C (T/F)	>30	>30
Ce703010054_2A2	C (T/F)	>30	>30
BF1266.431a	C (T/F)	>30	>30
246F C1G	C (T/F)	0,034	0,257
249M B10	C (T/F)	>30	>30
ZM247v1(Rev-)	C (T/F)	1,454	8,725
7030102001E5(Rev-)	C (T/F)	0,002	0,008
1394C9G1(Rev-)	C (T/F)	0,029	0,350
Ce704809221_1B3	C (T/F)	4,394	>30
CNE19	BC	>30	>30
CNE20	BC	0,002	0,006
CNE21	BC	0,002	0,007
CNE17	BC	0,020	0,109
CNE30	BC	0,019	0,059
CNE52	BC	0,012	0,045
CNE53	BC	0,003	0,011
CNE58	BC	0,024	0,073
MS208.A1	A	>30	>30
Q23.17	A	0,006	0,020
Q461.e2	A	>30	>30
Q769.d22	A	>30	>30
Q259.d2.17	A	>30	>30
Q842.d12	A	13,986	>30
3415.v1.c1	A	0,023	0,087
3365.v2.c2	A	0,013	0,037

191955_A11	A (T/F)	>30	>30
191084 B7-19	A (T/F)	0,011	0,043
9004SS_A3_4	A (T/F)	0,005	0,056
T257-31	CRF02_AG	>30	>30
928-28	CRF02_AG	0,761	3,934
263-8	CRF02_AG	1,380	7,548
T250-4	CRF02_AG	0,001	0,006
T251-18	CRF02_AG	0,086	0,328
T278-50	CRF02_AG	2,947	12,875
T255-34	CRF02_AG	>30	>30
211-9	CRF02_AG	1,299	5,529
235-47	CRF02_AG	0,005	0,017
620345.c01	CRF01_AE	>30	>30
CNE8	CRF01_AE	>30	>30
C1080.c03	CRF01_AE	5,369	>30
R2184.c04	CRF01_AE	>30	>30
R1166.c01	CRF01_AE	>30	>30
R3265.c06	CRF01_AE	>30	>30
C2101.c01	CRF01_AE	>30	>30
C3347.c11	CRF01_AE	>30	>30
C4118.c09	CRF01_AE	>30	>30
CNE5	CRF01_AE	>30	>30
BJOX009000.02.4	CRF01_AE	24,376	>30
BJOX015000.11.5	CRF01_AE (T/F)	>30	>30
BJOX010000.06.2	CRF01_AE (T/F)	>30	>30
BJOX025000.01.1	CRF01_AE (T/F)	>30	>30
BJOX028000.10.3	CRF01_AE (T/F)	0,474	14,851
X1193_c1	G	0,005	0,022
P0402_c2_11	G	0,005	0,029
X1254_c3	G	0,004	0,012
X2088_c9	G	0,004	0,009

X2131_C1_B5	G	0,002	0,008
P1981_C5_3	G	0,006	0,019
X1632_S2_B10	G	>30	>30
3016.v5.c45	D	>30	>30
A07412M1.vrc12	D	0,081	1,715
231965.c01	D	>30	>30
231966.c02	D	>30	>30
191821_E6_1	D (T/F)	14,076	>30
3817.v2.c59	CD	0,219	1,059
6480.v4.c25	CD	0,016	0,116
6952.v1.c20	CD	0,005	0,011
6811.v7.c18	CD	0,001	0,006
89-F1_2_25	CD	>30	>30
3301.v1.c24	AC	0,025	0,082
6041.v3.c23	AC	>30	>30
6540.v4.c1	AC	28,197	>30
6545.v4.c1	AC	>30	>30
0815.v3.c3	ACD	0,160	5,964
3103.v3.c10	ACD	0,002	0,005
BG505/T332N	A	<0,0001	0,002
YU2_WT	B	0,033	0,198
YU2_N276D	B	0,012	0,036
YU2_N332K	B	>30	>30
YU2_N160K	B	0,028	0,150
YU2_N280Y	B	0,005	0,016

Таблица 5. Значения IC_{50} и IC_{80} в TZM-bl анализе для BG18.

NC37			
ID вируса	**Группа**	**IC_{50}**	**IC_{80}**

6535.3	B	>30	>30
QH0692.42	B	0,582	2,054
SC422661.8	B	0,071	0,321
PVO.4	B	0,412	2,825
TRO.11	B	0,337	1,761
AC10.0.29	B	>30	>30
RHPA4259.7	B	0,345	2,289
THRO4156.18	B	>30	>30
REJO4541.67	B	0,104	0,304
TRJO4551.58	B	0,143	1,615
WITO4160.33	B	0,733	17,779
CAAN5342.A2	B	0,911	3,694
WEAU_d15_410_787	B (T/F)	0,037	0,133
1006_11_C3_1601	B (T/F)	0,054	0,207
1054_07_TC4_1499	B (T/F)	>30	>30
1056_10_TA11_1826	B (T/F)	1,048	5,510
1012_11_TC21_3257	B (T/F)	0,099	0,638
6240_08_TA5_4622	B (T/F)	1,236	6,388
6244_13_B5_4576	B (T/F)	5,574	>30
62357_14_D3_4589	B (T/F)	1,860	29,422
SC05_8C11_2344	B (T/F)	0,202	0,714
Du156.12	C	>30	>30
Du172.17	C	>30	>30
Du422.1	C	>30	>30
ZM197M.PB7	C	3,098	17,368
ZM214M.PL15	C	>30	>30
ZM233M.PB6	C	>30	>30
ZM249M.PL1	C	>30	>30
ZM53M.PB12	C	>30	>30
ZM109F.PB4	C	>30	>30
ZM135M.PL10a	C	>30	>30
CAP45.2.00.G3	C	>30	>30
CAP210.2.00.E8	C	>30	>30

HIV-001428-2.42	C	0,124	2,275
HIV-0013095-2.11	C	>30	>30
HIV-16055-2.3	C	>30	>30
HIV-16845-2.22	C	>30	>30
Ce1086_B2	C (T/F)	2,322	20,996
Ce0393_C3	C (T/F)	>30	>30
Ce1176_A3	C (T/F)	>30	>30
Ce2010_F5	C (T/F)	>30	>30
Ce0682_E4	C (T/F)	>30	>30
Ce1172_H1	C (T/F)	>30	>30
Ce2060_G9	C (T/F)	>30	>30
Ce703010054_2A2	C (T/F)	>30	>30
BF1266.431a	C (T/F)	>30	>30
246F C1G	C (T/F)	>30	>30
249M B10	C (T/F)	>30	>30
ZM247v1(Rev-)	C (T/F)	>30	>30
7030102001E5(Rev-)	C (T/F)	>30	>30
1394C9G1(Rev-)	C (T/F)	>30	>30
Ce704809221_1B3	C (T/F)	>30	>30
CNE19	BC	>30	>30
CNE20	BC	>30	>30
CNE21	BC	>30	>30
CNE17	BC	>30	>30
CNE30	BC	0,915	11,813
CNE52	BC	>30	>30
CNE53	BC	>30	>30
CNE58	BC	>30	>30
MS208.A1	A	>30	>30
Q23.17	A	>30	>30
Q461.e2	A	>30	>30
Q769.d22	A	0,242	1,574
Q259.d2.17	A	>30	>30

Q842.d12	A	0,255	1,821
3415.v1.c1	A	0,183	0,654
3365.v2.c2	A	>30	>30
191955_A11	A (T/F)	>30	>30
191084 B7-19	A (T/F)	0,064	0,208
9004SS_A3_4	A (T/F)	>30	>30
T257-31	CRF02_AG	>30	>30
928-28	CRF02_AG	>30	>30
263-8	CRF02_AG	0,269	1,523
T250-4	CRF02_AG	>30	>30
T251-18	CRF02_AG	1,835	7,857
T278-50	CRF02_AG	>30	>30
T255-34	CRF02_AG	>30	>30
211-9	CRF02_AG	>30	>30
235-47	CRF02_AG	14,369	>30
620345.c01	CRF01_AE	>30	>30
CNE8	CRF01_AE	>30	>30
C1080.c03	CRF01_AE	>30	>30
R2184.c04	CRF01_AE	0,025	0,082
R1166.c01	CRF01_AE	>30	>30
R3265.c06	CRF01_AE	>30	>30
C2101.c01	CRF01_AE	>30	>30
C3347.c11	CRF01_AE	>30	>30
C4118.c09	CRF01_AE	>30	>30
CNE5	CRF01_AE	>30	>30
BJOX009000.02.4	CRF01_AE	>30	>30
BJOX015000.11.5	CRF01_AE (T/F)	>30	>30
BJOX010000.06.2	CRF01_AE (T/F)	>30	>30
BJOX025000.01.1	CRF01_AE (T/F)	>30	>30
BJOX028000.10.3	CRF01_AE (T/F)	>30	>30

X1193_c1	G	>30	>30
P0402_c2_11	G	>30	>30
X1254_c3	G	>30	>30
X2088_c9	G	>30	>30
X2131_C1_B5	G	>30	>30
P1981_C5_3	G	>30	>30
X1632_S2_B10	G	>30	>30
3016.v5.c45	D	23,592	>30
A07412M1.vrc12	D	>30	>30
231965.c01	D	>30	>30
231966.c02	D	>30	>30
191821_E6_1	D (T/F)	9,963	>30
3817.v2.c59	CD	>30	>30
6480.v4.c25	CD	3,060	>30
6952.v1.c20	CD	0,104	0,477
6811.v7.c18	CD	>30	>30
89-F1_2_25	CD	17,963	>30
3301.v1.c24	AC	>30	>30
6041.v3.c23	AC	0,018	0,054
6540.v4.c1	AC	>30	>30
6545.v4.c1	AC	>30	>30
0815.v3.c3	ACD	0,022	0,082
3103.v3.c10	ACD	>30	>30
BG505/T332N	A		
YU2_WT	B	0,12	
YU2_N276D	B	NT	
YU2_N332K	B	0,05	
YU2_N160K	B	0,05	

YU2_N280Y	B	>30	

Таблица 6. Значения IC_{50} и IC_{80} в TZM-bl анализе для NC37.

BG1			
ID вируса	**Группа**	**IC_{50}**	**IC_{80}**
6535.3	B	0,322	1,130
QH0692.42	B	>30	>30
SC422661.8	B	>30	>30
PVO.4	B	>30	>30
TRO.11	B	>30	>30
AC10.0.29	B	0,012	0,043
RHPA4259.7	B	>30	>30
THRO4156.18	B	>30	>30
REJO4541.67	B	0,342	1,662
TRJO4551.58	B	>30	>30
WITO4160.33	B	0,002	0,014
CAAN5342.A2	B	>30	>30
WEAU_d15_410_787	B (T/F)	>30	>30
1006_11_C3_1601	B (T/F)	>30	>30
1054_07_TC4_1499	B (T/F)	>30	>30
1056_10_TA11_1826	B (T/F)	5,428	29,924
1012_11_TC21_3257	B (T/F)	>30	>30
6240_08_TA5_4622	B (T/F)	>30	>30
6244_13_B5_4576	B (T/F)	>30	>30
62357_14_D3_4589	B (T/F)	0,638	2,889
SC05_8C11_2344	B (T/F)	>30	>30
Du156.12	C	1,525	6,031
Du172.17	C	>30	>30
Du422.1	C	1,804	13,708
ZM197M.PB7	C	>30	>30
ZM214M.PL15	C	>30	>30
ZM233M.PB6	C	>30	>30
ZM249M.PL1	C	1,223	6,795
ZM53M.PB12	C	>30	>30

ZM109F.PB4	C	>30	>30
ZM135M.PL10a	C	>30	>30
CAP45.2.00.G3	C	0,149	0,383
CAP210.2.00.E8	C	>30	>30
HIV-001428-2.42	C	1,094	3,124
HIV-0013095-2.11	C	>30	>30
HIV-16055-2.3	C	4,296	16,939
HIV-16845-2.22	C	>30	>30
Ce1086_B2	C (T/F)	>30	>30
Ce0393_C3	C (T/F)	>30	>30
Ce1176_A3	C (T/F)	0,031	0,165
Ce2010_F5	C (T/F)	>30	>30
Ce0682_E4	C (T/F)	>30	>30
Ce1172_H1	C (T/F)	>30	>30
Ce2060_G9	C (T/F)	>30	>30
Ce703010054_2A2	C (T/F)	>30	>30
BF1266.431a	C (T/F)	>30	>30
246F C1G	C (T/F)	>30	>30
249M B10	C (T/F)	1,473	5,445
ZM247v1(Rev-)	C (T/F)	>30	>30
7030102001E5(Rev-)	C (T/F)	>30	>30
1394C9G1(Rev-)	C (T/F)	1,279	7,249
Ce704809221_1B3	C (T/F)	3,251	18,455
CNE19	BC	1,267	10,883
CNE20	BC	4,264	>30
CNE21	BC	>30	>30
CNE17	BC	>30	>30
CNE30	BC	>30	>30
CNE52	BC	0,975	5,008
CNE53	BC	1,318	7,470
CNE58	BC	>30	>30
MS208.A1	A	1,478	6,543

Q23.17	A	0,008	0,016
Q461.e2	A	>30	>30
Q769.d22	A	>30	>30
Q259.d2.17	A	>30	>30
Q842.d12	A	1,395	4,297
3415.v1.c1	A	14,412	>30
3365.v2.c2	A	1,161	4,272
191955_A11	A (T/F)	0,008	0,018
191084 B7-19	A (T/F)	>30	>30
9004SS_A3_4	A (T/F)	>30	>30
T257-31	CRF02_AG	>30	>30
928-28	CRF02_AG	>30	>30
263-8	CRF02_AG	>30	>30
T250-4	CRF02_AG	3,921	>30
T251-18	CRF02_AG	3,591	17,977
T278-50	CRF02_AG	19,313	>30
T255-34	CRF02_AG	11,589	>30
211-9	CRF02_AG	2,852	12,939
235-47	CRF02_AG	1,275	4,384
620345.c01	CRF01_AE	0,626	4,229
CNE8	CRF01_AE	>30	>30
C1080.c03	CRF01_AE	0,002	0,005
R2184.c04	CRF01_AE	>30	>30
R1166.c01	CRF01_AE	>30	>30
R3265.c06	CRF01_AE	0,611	3,438
C2101.c01	CRF01_AE	>30	>30
C3347.c11	CRF01_AE	>30	>30
C4118.c09	CRF01_AE	22,788	>30
CNE5	CRF01_AE	0,351	1,277
BJOX009000.02.4	CRF01_AE	>30	>30
BJOX015000.11.5	CRF01_AE (T/F)	>30	>30

BJOX010000.06.2	CRF01_AE (T/F)	>30	>30
BJOX025000.01.1	CRF01_AE (T/F)	>30	>30
BJOX028000.10.3	CRF01_AE (T/F)	>30	>30
X1193_c1	G	0,138	0,463
P0402_c2_11	G	>30	>30
X1254_c3	G	0,048	0,086
X2088_c9	G	>30	>30
X2131_C1_B5	G	0,116	0,313
P1981_C5_3	G	>30	>30
X1632_S2_B10	G	0,079	0,250
3016.v5.c45	D	>30	>30
A07412M1.vrc12	D	>30	>30
231965.c01	D	>30	>30
231966.c02	D	>30	>30
191821_E6_1	D (T/F)	>30	>30
3817.v2.c59	CD	11,147	>30
6480.v4.c25	CD	>30	>30
6952.v1.c20	CD	>30	>30
6811.v7.c18	CD	>30	>30
89-F1_2_25	CD	>30	>30
3301.v1.c24	AC	>30	>30
6041.v3.c23	AC	6,745	16,641
6540.v4.c1	AC	>30	>30
6545.v4.c1	AC	>30	>30
0815.v3.c3	ACD	>30	>30
3103.v3.c10	ACD	>30	>30
BG505/T332N	A	0,034	0,125

YU2_WT	B	15,816	>30
YU2_N276D	B	18,765	>30
YU2_N332K	B	19,434	>30
YU2_N160K	B	>30	>30
YU2_N280Y	B	8,998	23,023

Таблица 7. Значения IC_{50} и IC_{80} в TZM-bl анализе для BG1.

BG8			
ID вируса	**Группа**	**IC_{50}**	**IC_{80}**
6535.3	B	0,007	0,022
QH0692.42	B	0,106	0,383
SC422661.8	B	0,058	0,368
PVO.4	B	0,072	0,252
TRO.11	B	0,011	0,039
AC10.0.29	B	0,015	0,043
RHPA4259.7	B	0,023	0,083
THRO4156.18	B	>10	>10
REJO4541.67	B	>10	>10
TRJO4551.58	B	0,057	0,218
WITO4160.33	B	0,111	0,828
CAAN5342.A2	B	0,005	0,019
WEAU_d15_410_787	B (T/F)	0,031	0,112
1006_11_C3_1601	B (T/F)	0,002	0,006
1054_07_TC4_1499	B (T/F)	0,048	0,222
1056_10_TA11_1826	B (T/F)	0,038	0,168
1012_11_TC21_3257	B (T/F)	0,011	0,047
6240_08_TA5_4622	B (T/F)	0,038	0,131
6244_13_B5_4576	B (T/F)	0,091	0,380
62357_14_D3_4589	B (T/F)	>10	>10
SC05_8C11_2344	B (T/F)	0,017	0,048
Du156.12	C	0,010	0,036
Du172.17	C	0,049	0,194
Du422.1	C	0,047	0,113
ZM197M.PB7	C	>10	>10

ZM214M.PL15	C	0,415	2,970
ZM233M.PB6	C	0,058	0,371
ZM249M.PL1	C	>10	>10
ZM53M.PB12	C	>10	>10
ZM109F.PB4	C	>10	>10
ZM135M.PL10a	C	0,061	0,263
CAP45.2.00.G3	C	>10	>10
CAP210.2.00.E8	C	>10	>10
HIV-001428-2.42	C	0,035	0,126
HIV-0013095-2.11	C	>10	>10
HIV-16055-2.3	C	>10	>10
HIV-16845-2.22	C	0,727	3,930
Ce1086_B2	C (T/F)	>10	>10
Ce0393_C3	C (T/F)	>10	>10
Ce1176_A3	C (T/F)	0,022	0,070
Ce2010_F5	C (T/F)	>10	>10
Ce0682_E4	C (T/F)	>10	>10
Ce1172_H1	C (T/F)	0,019	0,083
Ce2060_G9	C (T/F)	>10	>10
Ce703010054_2A2	C (T/F)	>10	>10
BF1266.431a	C (T/F)	>10	>10
246F C1G	C (T/F)	0,035	0,119
249M B10	C (T/F)	>10	>10
ZM247v1(Rev-)	C (T/F)	0,042	0,146
7030102001E5(Rev-)	C (T/F)	0,009	0,019
1394C9G1(Rev-)	C (T/F)	0,031	0,093
Ce704809221_1B3	C (T/F)	0,084	0,395
CNE19	BC	0,075	>10
CNE20	BC	0,002	0,005
CNE21	BC	0,047	0,124
CNE17	BC	1,180	4,853
CNE30	BC	0,261	0,678

CNE52	BC	1,991	9,763
CNE53	BC	0,013	0,058
CNE58	BC	0,165	0,476
MS208.A1	A	>10	>10
Q23.17	A	0,005	0,015
Q461.e2	A	>10	>10
Q769.d22	A	>10	>10
Q259.d2.17	A	>10	>10
Q842.d12	A	>10	>10
3415.v1.c1	A	>10	>10
3365.v2.c2	A	0,057	0,200
191955_A11	A (T/F)	>10	>10
191084 B7-19	A (T/F)	0,026	0,108
9004SS_A3_4	A (T/F)	0,012	0,032
T257-31	CRF02_AG	>10	>10
928-28	CRF02_AG	0,616	2,396
263-8	CRF02_AG	0,416	5,714
T250-4	CRF02_AG	0,002	0,005
T251-18	CRF02_AG	0,399	2,292
T278-50	CRF02_AG	1,713	>10
T255-34	CRF02_AG	>10	>10
211-9	CRF02_AG	0,065	0,403
235-47	CRF02_AG	0,058	0,224
620345.c01	CRF01_AE	>10	>10
CNE8	CRF01_AE	>10	>10
C1080.c03	CRF01_AE	>10	>10
R2184.c04	CRF01_AE	>10	>10
R1166.c01	CRF01_AE	>10	>10
R3265.c06	CRF01_AE	>10	>10
C2101.c01	CRF01_AE	>10	>10
C3347.c11	CRF01_AE	>10	>10

C4118.c09	CRF01_AE	>10	>10
CNE5	CRF01_AE	>10	>10
BJOX009000.02.4	CRF01_AE	>10	>10
BJOX015000.11.5	CRF01_AE (T/F)	>10	>10
BJOX010000.06.2	CRF01_AE (T/F)	>10	>10
BJOX025000.01.1	CRF01_AE (T/F)	>10	>10
BJOX028000.10.3	CRF01_AE (T/F)	>10	>10
X1193_c1	G	0,070	0,207
P0402_c2_11	G	0,008	0,024
X1254_c3	G	0,063	0,239
X2088_c9	G	0,003	0,010
X2131_C1_B5	G	0,014	0,056
P1981_C5_3	G	0,004	0,013
X1632_S2_B10	G	>10	>10
3016.v5.c45	D	>10	>10
A07412M1.vrc12	D	0,011	0,037
231965.c01	D	>10	>10
231966.c02	D	>10	>10
191821_E6_1	D (T/F)	>10	>10
3817.v2.c59	CD	0,706	4,492
6480.v4.c25	CD	0,006	0,023
6952.v1.c20	CD	0,023	0,086
6811.v7.c18	CD	0,003	0,009
89-F1_2_25	CD	>10	>10
3301.v1.c24	AC	0,018	0,049
6041.v3.c23	AC	>10	>10
6540.v4.c1	AC	>10	>10
6545.v4.c1	AC	>10	>10

0815.v3.c3	ACD	0,043	0,197
3103.v3.c10	ACD	0,024	0,061

Таблица 8. Значения IC_{50} и IC_{80} в TZM-bl анализе для BG8.

10-1074			
ID вируса	**Группа**	**IC_{50}**	**IC_{80}**
6535.3	B	0,007	0,022
QH0692.42	B	0,106	0,383
SC422661.8	B	0,058	0,368
PVO.4	B	0,072	0,252
TRO.11	B	0,011	0,039
AC10.0.29	B	0,015	0,043
RHPA4259.7	B	0,023	0,083
THRO4156.18	B	>10	>10
REJO4541.67	B	>10	>10
TRJO4551.58	B	0,057	0,218
WITO4160.33	B	0,111	0,828
CAAN5342.A2	B	0,005	0,019
WEAU_d15_410_787	B (T/F)	0,031	0,112
1006_11_C3_1601	B (T/F)	0,002	0,006
1054_07_TC4_1499	B (T/F)	0,048	0,222
1056_10_TA11_1826	B (T/F)	0,038	0,168
1012_11_TC21_3257	B (T/F)	0,011	0,047
6240_08_TA5_4622	B (T/F)	0,038	0,131
6244_13_B5_4576	B (T/F)	0,091	0,380
62357_14_D3_4589	B (T/F)	>10	>10
SC05_8C11_2344	B (T/F)	0,017	0,048
Du156.12	C	0,010	0,036
Du172.17	C	0,049	0,194
Du422.1	C	0,047	0,113
ZM197M.PB7	C	>10	>10
ZM214M.PL15	C	0,415	2,970
ZM233M.PB6	C	0,058	0,371
ZM249M.PL1	C	>10	>10

ZM53M.PB12	C	>10	>10
ZM109F.PB4	C	>10	>10
ZM135M.PL10a	C	0,061	0,263
CAP45.2.00.G3	C	>10	>10
CAP210.2.00.E8	C	>10	>10
HIV-001428-2.42	C	0,035	0,126
HIV-0013095-2.11	C	>10	>10
HIV-16055-2.3	C	>10	>10
HIV-16845-2.22	C	0,727	3,930
Ce1086_B2	C (T/F)	>10	>10
Ce0393_C3	C (T/F)	>10	>10
Ce1176_A3	C (T/F)	0,022	0,070
Ce2010_F5	C (T/F)	>10	>10
Ce0682_E4	C (T/F)	>10	>10
Ce1172_H1	C (T/F)	0,019	0,083
Ce2060_G9	C (T/F)	>10	>10
Ce703010054_2A2	C (T/F)	>10	>10
BF1266.431a	C (T/F)	>10	>10
246F C1G	C (T/F)	0,035	0,119
249M B10	C (T/F)	>10	>10
ZM247v1(Rev-)	C (T/F)	0,042	0,146
7030102001E5(Rev-)	C (T/F)	0,009	0,019
1394C9G1(Rev-)	C (T/F)	0,031	0,093
Ce704809221_1B3	C (T/F)	0,084	0,395
CNE19	BC	0,075	>10
CNE20	BC	0,002	0,005
CNE21	BC	0,047	0,124
CNE17	BC	1,180	4,853
CNE30	BC	0,261	0,678
CNE52	BC	1,991	9,763
CNE53	BC	0,013	0,058
CNE58	BC	0,165	0,476

MS208.A1	A	>10	>10
Q23.17	A	0,005	0,015
Q461.e2	A	>10	>10
Q769.d22	A	>10	>10
Q259.d2.17	A	>10	>10
Q842.d12	A	>10	>10
3415.v1.c1	A	>10	>10
3365.v2.c2	A	0,057	0,200
191955_A11	A (T/F)	>10	>10
191084 B7-19	A (T/F)	0,026	0,108
9004SS_A3_4	A (T/F)	0,012	0,032
T257-31	CRF02_AG	>10	>10
928-28	CRF02_AG	0,616	2,396
263-8	CRF02_AG	0,416	5,714
T250-4	CRF02_AG	0,002	0,005
T251-18	CRF02_AG	0,399	2,292
T278-50	CRF02_AG	1,713	>10
T255-34	CRF02_AG	>10	>10
211-9	CRF02_AG	0,065	0,403
235-47	CRF02_AG	0,058	0,224
620345.c01	CRF01_AE	>10	>10
CNE8	CRF01_AE	>10	>10
C1080.c03	CRF01_AE	>10	>10
R2184.c04	CRF01_AE	>10	>10
R1166.c01	CRF01_AE	>10	>10
R3265.c06	CRF01_AE	>10	>10
C2101.c01	CRF01_AE	>10	>10
C3347.c11	CRF01_AE	>10	>10
C4118.c09	CRF01_AE	>10	>10
CNE5	CRF01_AE	>10	>10
BJOX009000.02.4	CRF01_AE	>10	>10

BJOX015000.11.5	CRF01_AE (T/F)	>10	>10
BJOX010000.06.2	CRF01_AE (T/F)	>10	>10
BJOX025000.01.1	CRF01_AE (T/F)	>10	>10
BJOX028000.10.3	CRF01_AE (T/F)	>10	>10
X1193_c1	G	0,070	0,207
P0402_c2_11	G	0,008	0,024
X1254_c3	G	0,063	0,239
X2088_c9	G	0,003	0,010
X2131_C1_B5	G	0,014	0,056
P1981_C5_3	G	0,004	0,013
X1632_S2_B10	G	>10	>10
3016.v5.c45	D	>10	>10
A07412M1.vrc12	D	0,011	0,037
231965.c01	D	>10	>10
231966.c02	D	>10	>10
191821_E6_1	D (T/F)	>10	>10
3817.v2.c59	CD	0,706	4,492
6480.v4.c25	CD	0,006	0,023
6952.v1.c20	CD	0,023	0,086
6811.v7.c18	CD	0,003	0,009
89-F1_2_25	CD	>10	>10
3301.v1.c24	AC	0,018	0,049
6041.v3.c23	AC	>10	>10
6540.v4.c1	AC	>10	>10
6545.v4.c1	AC	>10	>10
0815.v3.c3	ACD	0,043	0,197
3103.v3.c10	ACD	0,024	0,061

Таблица 9. Значения IC_{50} и IC_{80} в TZM-bl анализе для 10-1074

PGT121

ID вируса	Группа	IC_{50}	IC_{80}
6535.3	B	0,003	0,010
QH0692.42	B	0,498	8,507
SC422661.8	B	0,079	0,373
PVO.4	B	0,094	0,450
TRO.11	B	0,011	0,037
AC10.0.29	B	0,019	0,060
RHPA4259.7	B	0,013	0,046
THRO4156.18	B	>10	>10
REJO4541.67	B	>10	>10
TRJO4551.58	B	0,802	>10
WITO4160.33	B	0,301	3,200
CAAN5342.A2	B	0,008	0,026
WEAU_d15_410_787	B (T/F)	0,017	0,062
1006_11_C3_1601	B (T/F)	0,002	0,008
1054_07_TC4_1499	B (T/F)	0,041	0,299
1056_10_TA11_1826	B (T/F)	0,034	0,148
1012_11_TC21_3257	B (T/F)	0,008	0,034
6240_08_TA5_4622	B (T/F)	0,068	0,231
6244_13_B5_4576	B (T/F)	0,172	1,471
62357_14_D3_4589	B (T/F)	6,215	>10
SC05_8C11_2344	B (T/F)	0,030	0,108
Du156.12	C	0,006	0,019
Du172.17	C	0,062	0,531
Du422.1	C	0,017	0,088
ZM197M.PB7	C	>10	>10
ZM214M.PL15	C	0,288	2,456
ZM233M.PB6	C	2,809	>10
ZM249M.PL1	C	>10	>10
ZM53M.PB12	C	0,001	0,005
ZM109F.PB4	C	8,924	>10
ZM135M.PL10a	C	0,730	5,727
CAP45.2.00.G3	C	1,300	>10

CAP210.2.00.E8	C	>10	>10
HIV-001428-2.42	C	0,020	0,126
HIV-0013095-2.11	C	>10	>10
HIV-16055-2.3	C	0,772	7,986
HIV-16845-2.22	C	8,512	>10
Ce1086_B2	C (T/F)	0,003	0,016
Ce0393_C3	C (T/F)	>10	>10
Ce1176_A3	C (T/F)	0,022	0,063
Ce2010_F5	C (T/F)	>10	>10
Ce0682_E4	C (T/F)	>10	>10
Ce1172_H1	C (T/F)	0,007	0,030
Ce2060_G9	C (T/F)	>10	>10
Ce703010054_2A2	C (T/F)	>10	>10
BF1266.431a	C (T/F)	>10	>10
246F C1G	C (T/F)	0,082	0,363
249M B10	C (T/F)	>10	>10
ZM247v1(Rev-)	C (T/F)	0,036	0,123
7030102001E5(Rev-)	C (T/F)	0,016	0,042
1394C9G1(Rev-)	C (T/F)	0,823	6,227
Ce704809221_1B3	C (T/F)	0,043	0,285
CNE19	BC	0,012	0,083
CNE20	BC	0,003	0,006
CNE21	BC	0,009	0,031
CNE17	BC	3,962	>10
CNE30	BC	0,088	0,288
CNE52	BC	4,914	>10
CNE53	BC	0,014	0,062
CNE58	BC	>10	>10
MS208.A1	A	>10	>10
Q23.17	A	0,005	0,017
Q461.e2	A	>10	>10
Q769.d22	A	>10	>10

Q259.d2.17	A	3,071	>10
Q842.d12	A	0,010	0,037
3415.v1.c1	A	>10	>10
3365.v2.c2	A	0,243	2,133
191955_A11	A (T/F)	>10	>10
191084 B7-19	A (T/F)	0,038	0,118
9004SS_A3_4	A (T/F)	0,006	0,016
T257-31	CRF02_AG	>10	>10
928-28	CRF02_AG	>10	>10
263-8	CRF02_AG	0,647	4,680
T250-4	CRF02_AG	0,003	0,009
T251-18	CRF02_AG	5,183	>10
T278-50	CRF02_AG	>10	>10
T255-34	CRF02_AG	2,631	>10
211-9	CRF02_AG	0,866	6,631
235-47	CRF02_AG	0,259	1,601
620345.c01	CRF01_AE	>10	>10
CNE8	CRF01_AE	>10	>10
C1080.c03	CRF01_AE	>10	>10
R2184.c04	CRF01_AE	>10	>10
R1166.c01	CRF01_AE	>10	>10
R3265.c06	CRF01_AE	>10	>10
C2101.c01	CRF01_AE	>10	>10
C3347.c11	CRF01_AE	>10	>10
C4118.c09	CRF01_AE	>10	>10
CNE5	CRF01_AE	>10	>10
BJOX009000.02.4	CRF01_AE	9,001	>10
BJOX015000.11.5	CRF01_AE (T/F)	>10	>10
BJOX010000.06.2	CRF01_AE (T/F)	>10	>10
BJOX025000.01.1	CRF01_AE (T/F)	>10	>10
BJOX028000.10.3	CRF01_AE (T/F)	>10	>10

X1193_c1	G	0,022	0,088
P0402_c2_11	G	0,007	0,022
X1254_c3	G	0,029	0,085
X2088_c9	G	0,007	0,022
X2131_C1_B5	G	0,011	0,037
P1981_C5_3	G	0,002	0,009
X1632_S2_B10	G	>10	>10
3016.v5.c45	D	>10	>10
A07412M1.vrc12	D	0,034	0,255
231965.c01	D	>10	>10
231966.c02	D	>10	>10
191821_E6_1	D (T/F)	>10	>10
3817.v2.c59	CD	>10	>10
6480.v4.c25	CD	0,008	0,029
6952.v1.c20	CD	0,049	0,348
6811.v7.c18	CD	0,002	0,007
89-F1_2_25	CD	>10	>10
3301.v1.c24	AC	0,013	0,041
6041.v3.c23	AC	>10	>10
6540.v4.c1	AC	>10	>10
6545.v4.c1	AC	>10	>10
0815.v3.c3	ACD	0,017	0,085
3103.v3.c10	ACD	0,024	0,073

Таблица 10. Значения IC_{50} и IC_{80} в TZM-bl анализе для PGT121

Титры в клетках TZM.bl (мкг/мл)			
NC37+BG1+BG18			
ID вируса	**Группа**	**IC_{50}**	**IC_{80}**
6535.3	B	0,006	0,030
QH0692.42	B	0,033	0,130

SC422661.8	B	0,024	0,089
PVO.4	B	0,012	0,050
TRO.11	B	0,004	0,015
AC10.0.29	B	0,006	0,016
RHPA4259.7	B	0,210	1,669
THRO4156.18	B	>50	>50
REJO4541.67	B	0,199	0,696
TRJO4551.58	B	0,938	7,063
WITO4160.33	B	0,021	0,075
CAAN5342.A2	B	0,036	0,162
YU2.DG	B	0,052	0,147
WEAU_d15_410_787	B (T/F)	0,022	0,074
1006_11_C3_1601	B (T/F)	0,005	0,013
1054_07_TC4_1499	B (T/F)	0,022	0,122
1056_10_TA11_1826	B (T/F)	0,031	0,266
1012_11_TC21_3257	B (T/F)	0,012	0,055
6240_08_TA5_4622	B (T/F)	0,009	0,028
6244_13_B5_4576	B (T/F)	0,045	0,216
62357_14_D3_4589	B (T/F)	0,840	5,585
SC05_8C11_2344	B (T/F)	0,045	0,083
Du156.12	C	0,018	0,050
Du172.17	C	>50	>50
Du422.1	C	0,076	0,347
ZM197M.PB7	C	4,123	>50
ZM214M.PL15	C	>50	>50
ZM233M.PB6	C	7,814	>50
ZM249M.PL1	C	2,916	17,336
ZM53M.PB12	C	>50	>50
ZM109F.PB4	C	>50	>50
ZM135M.PL10a	C	6,018	31,451
CAP45.2.00.G3	C	0,251	1,097
CAP210.2.00.E8	C	19,144	>50
HIV-001428-2.42	C	0,029	0,075
HIV-0013095-2.11	C	31,333	>50

HIV-16055-2.3	C	12,372	43,320
HIV-16845-2.22	C	0,092	0,316
Ce1086_B2	C (T/F)	2,088	13,998
Ce0393_C3	C (T/F)	>50	>50
Ce1176_A3	C (T/F)	0,013	0,030
Ce2010_F5	C (T/F)	>50	>50
Ce0682_E4	C (T/F)	>50	>50
Ce1172_H1	C (T/F)	0,017	0,047
Ce2060_G9	C (T/F)	>50	>50
Ce703010054_2A2	C (T/F)	>50	>50
BF1266.431a	C (T/F)	45,589	>50
246F C1G	C (T/F)	0,172	1,220
249M B10	C (T/F)	4,422	17,159
ZM247v1(Rev-)	C (T/F)	6,417	>50
7030102001E5(Rev-)	C (T/F)	0,011	0,035
1394C9G1(Rev-)	C (T/F)	0,078	1,405
Ce704809221_1B3	C (T/F)	10,937	>50
CNE19	BC	1,576	17,656
CNE20	BC	0,008	0,024
CNE21	BC	0,009	0,022
CNE17	BC	0,195	0,709
CNE30	BC	0,067	0,183
CNE52	BC	0,077	0,199
CNE53	BC	0,015	0,036
CNE58	BC	0,055	0,206
MS208.A1	A	2,393	17,933
Q23.17	A	0,009	0,024
Q461.e2	A	>50	>50
Q769.d22	A	0,364	2,151
Q259.d2.17	A	>50	>50
Q842.d12	A	0,405	1,371
0260.v5.c36	A	0,018	0,055
3415.v1.c1	A	0,039	0,187
3365.v2.c2	A	0,020	0,049

191955_A11	A (T/F)	0,830	4,335
191084 B7-19	A (T/F)	0,029	0,071
9004SS_A3_4	A (T/F)	0,027	0,090
T257-31	CRF02_AG	>50	>50
928-28	CRF02_AG	1,919	7,522
263-8	CRF02_AG	0,544	3,759
T250-4	CRF02_AG	0,005	0,029
T251-18	CRF02_AG	0,133	0,639
T278-50	CRF02_AG	9,069	44,006
T255-34	CRF02_AG	37,020	>50
211-9	CRF02_AG	1,976	18,953
235-47	CRF02_AG	0,013	0,046
620345.c01	CRF01_AE	1,325	8,233
CNE8	CRF01_AE	>50	>50
C1080.c03	CRF01_AE	0,012	0,042
R2184.c04	CRF01_AE	0,084	0,376
R1166.c01	CRF01_AE	>50	>50
C2101.c01	CRF01_AE	>50	>50
C3347.c11	CRF01_AE	>50	>50
C4118.c09	CRF01_AE	>50	>50
CNE5	CRF01_AE	1,465	6,578
BJOX009000.02.4	CRF01_AE	>50	>50
BJOX015000.11.5	CRF01_AE (T/F)	>50	>50
BJOX010000.06.2	CRF01_AE (T/F)	>50	>50
BJOX025000.01.1	CRF01_AE (T/F)	>50	>50
BJOX028000.10.3	CRF01_AE (T/F)	>50	>50
X1193_c1	G	0,036	0,130
P0402_c2_11	G	0,023	0,088
X1254_c3	G	0,016	0,038
X2088_c9	G	0,007	0,021
X2131_C1_B5	G	0,016	0,036
P1981_C5_3	G	0,022	0,063
X1632_S2_B10	G	0,275	0,986
3016.v5.c45	D	8,359	>50

A07412M1.vrc12	D	0,189	2,455
231965.c01	D	>50	>50
231966.c02	D	>50	>50
191821_E6_1	D (T/F)	>50	>50
3817.v2.c59	CD	0,582	2,883
6480.v4.c25	CD	0,108	0,476
6952.v1.c20	CD	0,011	0,027
6811.v7.c18	CD	0,009	0,035
89-F1_2_25	CD	5,379	>50
3301.v1.c24	AC	0,074	0,260
6041.v3.c23	AC	0,085	0,233
6540.v4.c1	AC	>50	>50
6545.v4.c1	AC	>50	>50
0815.v3.c3	ACD	0,071	0,321
3103.v3.c10	ACD	0,009	0,017

Таблица 11. Значения IC_{50} и IC_{80} в TZM-bl анализе для комбинации 1:1:1 NC37, BG1 и BG18 к панели из 118 вирусов

BG18

На уровне аминокислот BG18 на 63% и 62% идентичен тяжелым цепям 10-1074 и PGT121, соответственно, оба из которых происходят из предшественника зародышевой линии V_H4-59. BG18 происходит из близкородственного (90,8% идентичности) гена зародышевой линии V_H4-4 (фиг.6A). Выравнивание определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелых цепей PGT121, 10-1074 и BG18 и их клональных вариантов, показало высокую степень идентичности между CDRH1 и CDRH2. CDRH3 BG18 на три остатка короче, чем у PGT121/10-1074 (21 против 24 остатков; фиг. 2A и фиг. 6B). Кроме того, BG18 имеет 6 из 7 мутаций в каркасных областях, которые являются общими для семейства PGT121 (фиг. 2A), но в отличие от членов PGT121/10-1074 не содержит никаких вставок или делеций.

BG18 содержит сегмент V_L2-25 гена VL и на уровне аминокислотной последовательности имеет только 46% и 50% идентичности с сегментом V_L3-21 гена, содержащимся в PGT121 и 10-1074, соответственно (фиг. 2B, фиг. 6C и фиг. 6D). Кроме того, легкие цепи BG18 и его вариантов имеют немного больше мутаций по сравнению с 10-1074 и PGT121, но, как и тяжелые цепи, не содержат никаких вставок или делеций. Таким образом, BG18 и его

клональные варианты имеют тяжелые цепи, аналогичные таковым у ранее выделенных антител класса PGT121/10-1074, но отличающиеся легкие цепи.

Кристаллическая структура Fab BG18 с разрешением 1,3 Å показала, что петли CDR образуют компактный связывающий участок, за исключением CDRH3, который выступает на ~11 Å за пределы других CDR в виде вершины, состоящей преимущественно из гидрофобных остатков (фиг. 2C). Вместо того, чтобы полностью развернуться, CDRH3 снова сворачивается в конформацию, стабилизированную водородными связями между остатками Gly100aHC, Val100bHC, Val100cHC, Gly100eHC и Glu100fHC в CDRH3 (фиг.2C). CDRL2 имеет неупорядоченную структуру, что позволяет предположить, что он может принимать множественные конформации в несвязанном антителе. Наложение несвязанных структур BG18, PGT121 (PDB 4FQ1) и 10-1074 Fab (PDB 4FQ2) показало, что согласно результатам выравнивания их домены V_H являются в высокой степени идентичными, за исключением CDRH3, который расположен над доменом V_H в BG18, но заметно наклоняется над V_L в структурах Fab PGT121 и 10-1074 (фиг. 2D). В соответствии с низкими уровнями идентичностей последовательностей легких цепей BG18 и PGT121 (фиг. 2B, фиг. 6C и фиг. 6D), выровненные домены V_L (среднеквадратичные отклонения 3,1 Å были найдены при совмещении атомов 93 или 92 Cα при сравнении легких цепей в суперпозициях BG18-PGT121 и BG18-10-1074, соответственно) показали различия в ориентациях всех петель CDRL (фиг.2D). Несмотря на эти различия, щель между CDRH2 и CDRH3 в PGT121 и 10-1074 также видна в BG18 (фиг. 2E). Остатки, выстилающие эту щель, взаимодействуют с N-гликаном комплексного типа в гликозилированной структуре Fab PGT121 и взаимодействуют с N-гликаном, присоединенным к $Asn137_{gp120}$ в структуре комплекса PGT122-BG505 SOSIP (PDB 4TVP). У BG18 наблюдается вторая щель между CDRH3 и CDRL1/CDRL3, которая не может быть образована у PGT121 и его клональных родственниках из-за расположения CDRH3 в этих антителах над легкой цепью (фиг. 2E). В дополнение к этим структурным различиям электростатический поверхностный потенциал доменов V_H-V_L BG18 показывает другое распределение положительно заряженных участков по сравнению с поверхностными потенциалами у PGT121 и 10-1074 (фиг.7). В сумме, эти результаты согласуются с различиями в распознавании Env антителом BG18 по сравнению с распознаванием PGT121-родственными bNAb.

Для изучения того, как BG18 распознает Env, была создана структура, с разрешением ~25 Å, единичной частицы тримера BG505 SOSIP.664 в комплексе с Fabs из BG18 и CD4bs bNAb 179NC75 с помощью электронной микроскопии (ЭМ) после негативного окрашивания. Вписывание координат из кристаллической структуры FG BG18 в ЭМ карту (фиг. 2F) позволило сравнить углы сближения и потенциальные Env-взаимодействия BG18 и других $Asn332_{gp120}$-V3 bNAb (фиг. 2G). Аналогично PGT122 (вариант PGT121) и 10-1074, CDRH3 BG18, по прогнозам, взаимодействует с гликаном $Asn332_{gp120}$ и мотивом $_{324}GDIR_{327}$ gp120. Однако в то время как PGT122 и 10-1074 демонстрируют сходные углы сближения при связывании с Env, BG18 связывается с тримером Env под другим углом, смещенным на 34-41° относительно PGT122 и PGT124 (фиг. 2G).

BG18 оценивали на нейтрализацию относительно панели псевдовирусов ВИЧ-1 с делециями специфических N-связанных сайтов гликозилирования. Результаты показали, что ни один из гликанов у основания петли V3, за исключением $Asn332_{gp120}$, не оказывает влияния на нейтрализующую активность (таблица 12). В соответствии с этими данными BG18 связывается преимущественно с синтетическими гликопептидами V3, содержащими олигоманнозные N-гликаны в положении $Asn332_{gp120}$, а не с гликопептидами, содержащими N-гликаны комплексного типа, присоединенные к этому положению, или с другими потенциальными N-связанными сайтами гликозилирования в gp120 (фиг.9). Эти данные предполагают, что свойства распознавания у BG18 более сходны с 10-1074, чем с PGT121.

	BG8	**BG18**	**PGT121**	**12A12**
BG505 (T332N)	0,007	0,001	0,012	0,030
N137A	0,003	0,001	0,002	0,027
N156A	0,008	0,001	0,007	0,024
N295A	0,009	0,001	0,014	0,044
N301A	0,004	0,001	0,011	0,027
N339A	0,007	0,001	0,016	ND
N386A	0,004	0,001	0,015	0,030
N392A	0,005	0,001	0,006	0,012
	BG8	**BG18**	**PGT121**	**12A12**
JR-CSF	0,009	0,001	0,011	0,233
N295A	0,006	0,001	0,016	0,203

N301A	0,006	0,001	0,011	0,010
N332A	> 50	> 50	> 50	0,240
N339A	0,010	0,001	0,007	0,028
N362A	0,008	0,001	0,018	0,267
N386A	0,012	0,001	0,024	0,332
N392A	0,014	0,002	0,017	0,230
G324A	0,005	0,001	0,044	0,236
D325A	0,005	0,001	0,079	0,203
I326A	0,005	0,001	0,024	0,278
R327A	0,005	0,001	0,018	0,131
Q328A	0,023	0,001	0,057	0,038
H330A	0,050	0,001	0,017	0,288
	BG8	**BG18**	**PGT121**	**12A12**
92BR020	0,015	0,001	0,004	0,050
N136A	0,005	0,001	0,002	0,027
N156A	0,011	0,001	0,003	0,035
N301A	0,009	0,001	0,003	0,011
N332A	> 50	> 50	0,080	0,039
N386A	0,012	0,003	0,006	0,055
N392A	0,023	0,001	0,007	0,105
D325A	0,006	0,001	0,006	0,050
I326A	0,006	0,001	0,002	0,011
R327A	0,011	0,001	0,001	0,022
Q328A	0,018	0,001	0,002	0,028
H330A	0,018	0,001	0,003	0,073
N136A+N332A	> 50	> 50	> 1	0,025
N156A+N332A	> 50	> 50	> 1	0,023
N301A+N332A	> 50	> 50	> 1	0,007
N136A+N156A+N301A	0,001	0,001	0,001	0,013

Таблица 12. Значения IC_{50} и IC_{80} в TZM-bl анализе BG18, BG8 PGT121 и контрольного mAb 12A12 по отношению к выбранным мутантам оболочки V3.

NC37

Кристаллическая структура Fab NC37 (фиг. 1C) с разрешением 2,7 Å, связанного с кором gp120, подтвердила, что NC37

распознает CD4bs (фиг. 8A и 8B). Исходя только из последовательности, сначала было трудно определить, был ли V_H NC37 получен из гена зародышевой линии V_H1-2 или V_H1-46, потому что некоторые члены семейства NC37 были выровнены относительно V_H1-2, в то время как другие были выровнены относительно V_H1-46 (таблица 13). Однако сравнение структур показало, что NC37 принимает ту же ориентацию и угол связывания, что и антитела 8ANC131/134, полученные из V_H1-46 (фиг. 8A и 8B). Как следствие, для связывания с остатком $Asn280_{gp120}$ петли D у NC37 задействована легкая цепь, тогда как в антителах, полученных из V_H1-2, таких как NIH45-46, для связывания с $Asn280_{gp120}$ используются тяжелые цепи. CDRH3 NC37 простирается в направлении внутреннего домена gp120, образуя контакты между остатком $Tyr100G_{HC}$ в CDRH3 и остатками $Lys97_{gp120}$ и $Glu102_{gp120}$ внутреннего домена gp120. Наложение комплекса NC37 Fab-gp120 NC37 на структуру тримера SOSIP позволяет предположить, что CDRH3 NC37 связывается с соседним протомером в тримере Env (фиг. 8C).

NC37 был выделен в 2010 году, тогда как BG1 и BG18 были выделены из PBMC, собранных в 2014 году. Доступные PBMC были исследованы в 2010 и 2013 годах с использованием праймеров для ПЦР, специфичных для BG1 и BG18. В то время как транскрипты BG1 были обнаружены в оба момента времени, BG18 был впервые обнаружен в 2013 году. Это указывает на то, что BG18 возник в период между 2010 и 2013 годами, тогда как BG1 и NC37 появились ранее.

Аутологичная нейтрализация

Для изучения влияния трех bNAb на аутологичные вирусы, отдельные гены env из циркулирующих в плазме вирусов были подвергнуты одногеномному секвенированию (SGS) из пяти разных временных периодов в течение 2006-2015 гг. (2006, 2010, 2013, 2014 и 2015 гг.). Внутри рамки считывания были восстановлены только 37 функциональных транскриптов частично из-за вирусной нагрузки, которая во всех временных точках была ниже 400 копий/мл. Более того, все последовательности, восстановленные с 2015 года, были нефункциональными (фиг.10). 37 функциональных последовательностей сформировали три кластера – кластер A, содержащий одну последовательность 2006 года, которая отличалась на ~15% от остальных последовательностей, кластер B, самый большой кластер, содержащий последовательности всех четырех временных точек, и кластер C, содержащий 3 последовательности,

все 2014 года (фиг. 3A). В период с 2013 по 2014 год наблюдалось увеличение вирусного разнообразия, что согласуется с появлением нового кластера последовательностей в 2014 году (фиг. 3B).

Все три последовательности в кластере C содержали мутации, изменяющие N-связанный сайт гликозилирования в $Asn332_{gp120}$, тогда как другие 34 последовательности имели интактный N-связанный сайт гликозилирования в $Asn332_{gp120}$ (фиг. 3A). Кроме того, все три последовательности в кластере C имели остаток $Asp282_{gp120}$, который не был обнаружен в других 34 последовательностях. 94,4% всех последовательностей ВИЧ-1 в базе данных Los Alamos в положении 282_{gp120} содержат Lys, а Asp в этом положении связан с устойчивостью к CD4bs антителам.

Для определения чувствительности функциональных Env к 3 аутологичным bNAb были получены псевдовирусы, которые были протестированы с помощью TZM-bl анализа. Из 35 успешно созданных псевдовирусов только 4 оказались устойчивыми ко всем 3 bNAb. Это были Env из кластера C, обнаруженные в плазме 2014 года, и один из 2013 (фиг. 3C и фиг. 10). Оставшиеся 31 псевдовирус (88,5% от всех псевдовирусов) оказались чувствительными по меньшей мере к 1 из 3 bNAb. Кроме того, псевдовирусы 2006, 2010 и 2014 годов были протестированы на чувствительность к параллельному сывороточному IgG, выделенному в тот же момент времени, что и вирусные гены env (IgG из плазмы 2013 года не был доступен для этого анализа). Результаты показали, что параллельно выделенный IgG оказывал нейтрализующее действие на 19 из 22 протестированных вирусов (фиг. 3C и фиг. 10).

Вирусы, чувствительные к BG18 и NC37, а также вирусы, чувствительные к конкурентному IgG, были обнаружены во всех проанализированных временных точках, включая временные точки, в которых были выделены BG18 и NC37 (фиг. 3D). Напротив, большинство штаммов, за исключением одного вируса 2006 года, оказались устойчивыми к BG1. Это говорит о том, что большинство аутологичных вирусов у донора EB354 ускользнуло от BG1, но не смогло ускользнуть от антител BG18 и NC37, что указывает на широту спектра действия и эффективность BG18 и NC37.

Хотя получение вирусных последовательностей из образцов плазмы 2015 года оказалось невозможным, оказалось возможным получить вирус из двух из пяти культур CD4+ EB354 для размножения вируса (VOC). Согласно результатам p24 ИФА, в обоих случаях потребовалось более пяти недель для того, чтобы культуры

стали положительными в отношении вируса. Последовательности SGS из обеих культур для размножения вируса 2015 года сгруппированы рядом с последовательностями кластера C и не содержат N-связанный сайт гликозилирования в $Asn332_{gp120}$ (фиг. 3A). Кроме того, все последовательности показали наличие $Asp282_{gp120}$. В соответствии с этими данными культуральные супернатанты 2015 года были устойчивы ко всем трем bNAb в анализах TZM-bl (фиг. 3E).

***In vivo* эффективность BG18, NC37 и BG1**

Для определения, способны ли BG18 или NC37 независимо оказывать селективное давление на ВИЧ-1 *in vivo*, гуманизированных мышей (hu-мышей) инфицировали ВИЧ-1_{YU2}, и установленную инфекцию лечили. BG1 показал низкую активность против ВИЧ-1_{YU2} (IC_{50}=15,8 мкг/мл) и поэтому использовался только в последующих экспериментах по комбинированному лечению, а не в экспериментах по монотерапии. Подобно 10-1074, введение BG18 или BG8, менее мощного, но все еще эффективного клонального варианта, было связано с быстрым снижением (в среднем 1,5 log_{10}) вирусной нагрузки с последующей рикошетной виремией (фиг. 4A, фиг. 11 и Фиг.12). Все вирусные последовательности, вызывающие рикошетную реакцию, содержали мутацию, которая изменяла N-связанный сайт гликозилирования в $Asn332_{gp120}$ (фиг. 4B и 4C). Монотерапия NC37 также временно подавляла виремию, но величина снижения вирусной нагрузки была менее выраженной, чем при BG18, в среднем 0,5 log_{10} (фиг. 4A и фиг. 12). Это указывает на то, что BG18 и NC37 эффективны для лечения ВИЧ, причем BG18 обладает наиболее выраженными эффектами. Большинство последовательностей Env вируса с рикошетной реакцией на NC37 показали мутацию R456K, которая связана с устойчивостью к анти-CD4bs антителам (фиг. 4B и 4C). Это дополнительно указывает на то, что BG18 и NC37 позволяют отобрать устойчивые к антителам ВИЧ-1_{YU2} варианты *in vivo* у hu-мышей.

Комбинации антител могут контролировать инфекцию ВИЧ-1_{YU2} у hu-мышей. Чтобы определить, может ли комбинация BG18, NC37 и BG1 контролировать виремию, пять ВИЧ-1_{YU2}-инфицированных hu-мышей обрабатывали комбинацией 1:1:1 трех bNAb (BG18, NC37 и BG1). Вскоре после введения трех bNAb вирусная нагрузка снизилась у всех животных в среднем на 1,74 Log_{10}, и, к удивлению, 4/5 мышей продемонстрировали практически не обнаруживаемую вирусную нагрузку через 3 недели (фиг. 4D и 4E). Виремия восстановилась

только у одной мыши, T6, и это произошло только через 3 недели после прекращения терапии. Остальные 4 мыши продолжали демонстрировать фактически недетектируемую виремию даже спустя 4 недели после окончания терапии (фиг.4D и 4E). Это указывает на то, что независимо от того, применяются ли NC37, BG1 и BG18 по отдельности, но особенно в комбинации, NC37, BG1 и особенно BG18 эффективны для длительного подавления и нейтрализации ВИЧ-1 *in vivo*.

АНТИТЕЛО	БЛИЖАЙШИЙ VH	БЛИЖАЙШИЙ VL	СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ В V (nt) %		ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ CDRH3
			VH	VL	
NC37	1-2/1-46	K3-20	28.8	27.9	DNFGTRPVPGRGYYYGMDV (SEQ ID NO: 105)
NC133	1-46	K3-20	28	23.2	DNRGDRNVPGRGYYYGMDV (SEQ ID NO: 106)
NC102	1-2	K3-20	27.1	22.2	DNFGTRPVPGRGYYYGMDV (SEQ ID NO: 107)
AC40	1-46	K3-20	33.5	21.1	DNFGESHKGYTYGMDA (SEQ ID NO: 108)
AC41	1-46	K3-20	30.1	21.5	DNFGESHKGYTYGMDA (SEQ ID NO: 109)
AC72	1-46	K3-20	29.8	20.8	DNFGESHKGYTYGMDA (SEQ ID NO: 110)
BG8	4-4	L3-25	25.4	20.5	NVIRVFGVISLGEWFHYGMDV (SEQ ID NO: 4)
BG18	4-4	L3-25	21.2	17.7	NAIRIYGVVALGEWFHYGMDV (SEQ ID NO: 12)
BG33	4-4	L3-25	25	18.4	NVIRVFGVISLGEWFHYGMDV (SEQ ID NO: 28)
BG42	4-4	L3-25	23.7	19.4	NVIRVFGVISLGEWFHYGMDV (SEQ ID NO: 20)
BG1	3-49	K1-39	27.2	19.9	EQRNKDYRYGQEGFGYSYGMDV (SEQ ID NO: 76)
BG22	3-49	K1-39	26.8	23.4	EQRGGDGRYSGDGFGYPYGMDV (SEQ ID NO: 84)

BG47	3-49	K1-39	27.1	22	EQRGANGRYGGDGFGYSYGMDV (SEQ ID NO: 92)

Таблица 13. Нейтрализующие клоны. Генетическая характеристика 13 антител, репрезентативных вариантов от каждого из трех клонов (синий, пурпурный и зеленый), которые проявили нейтрализующую активность. Указаны V_H, V_L и уровень мутаций, а также последовательность CDRH3 (согласно IMGT).

Приведенные выше примеры и описание предпочтительных вариантов осуществления следует рассматривать как иллюстрацию, а не как ограничение настоящего изобретения, определенного формулой изобретения. Следует понимать, что многочисленные варианты и комбинации изложенных выше признаков могут использоваться без отклонения от настоящего изобретения, изложенного в формуле изобретения. Такие изменения не рассматриваются как отступление от объема изобретения, и все такие варианты включены в объем приведенной ниже формулы изобретения. Все ссылки, цитируемые в настоящем описании, включены во всей их полноте в виде ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащие первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент,

где первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигесвязывающий фрагмент являются разными,

где первый антигенсвязывающий фрагмент содержит (i) первую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и (ii) первую вариабельную область легкой цепи, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и

где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 первого антигенсвязывающего фрагмента содержат соответствующие последовательности SEQ ID NO: 10-12 и 14-16.

2. Биспецифическое антитело по п. 1 или его антигенсвязывающая часть, где первая тяжелая цепь и первая легкая цепь содержит соответствующие последовательности SEQ ID NO: 9 и 13.

3. Биспецифическое антитело по п. 1 или п. 2 или его антигенсвязывающая часть,

где второй антигенсвязывающий фрагмент содержит (i) вторую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и (ii) вторая вариабельная область легкой цепи, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и

где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 второго антигенсвязывающего фрагмента содержат соответствующие последовательности набора CDR, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-4 и 6-8, SEQ ID NO: 18-20 и 22-24, SEQ ID NO: 26-28 и 30-32, SEQ ID NO: 34-36 и 38-40, SEQ ID NO: 42-44 и 46-48, SEQ ID NO: 50-52 и 54-56, SEQ ID NO: 58-60 и 62-64, SEQ ID NO: 66-68 и 70-72, SEQ ID NO: 74-76 и 78-80, SEQ ID NO: 82-84 и 86-88, и SEQ ID NO: 90-92 и 94-96.

4. Биспецифическое антитело по п. 3 или его антигенсвязывающая часть, где вторая тяжелая цепь и вторая легкая цепь содержат соответствующие последовательности пары, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 5, SEQ ID NO: 17 и 21, SEQ ID NO: 25 и 29, SEQ ID NO: 33 и 37, SEQ ID NO: 41 и 45, SEQ ID NO: 49 и 53, SEQ ID NO: 57 и 61, SEQ ID NO: 65 и 69, SEQ ID NO: 73 и 77, SEQ ID NO: 81 и 85, и SEQ ID NO: 89 и 93.

5. Биспецифическое антитело по п. 1 или п. 2 или его антигенсвязывающая часть, где второй антигенсвязывающий фрагмент

содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи анти-HIV антитела, выбранного из группы, состоящей из NC37, NC133, NC102, AC40, AC41, AC72, 3BNC117, BG1, VRC01, PGT121, PGT145 и 10-1074.

6. Биспецифическое антитело по п. 5 или его антигенсвязывающая часть, где второй антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи анти-HIV антитела, выбранного из группы, состоящей из NC37, VRC01 и 3BNC117.

7. Биспецифическое антитело по п. 5 или его антигенсвязывающая часть, где второй антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи анти-HIV антитела, выбранного из группы, состоящей из BG1 и PGT145.

8. Биспецифическое антитело по п. 5 или его антигенсвязывающая часть, где второй антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи анти-HIV антитела, выбранного из группы, состоящей из PGT121 и 10-1074.

9. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-8 или его антигенсвязывающая часть, где антитело представляет собой человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело.

10. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-8 или его антигенсвязывающая часть, где антитело или его антигенсвязывающая получены рекомбинантным способом.

11. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую биспецифическое антитело по любому из пп. 1-10 или его антигенсвязывающую часть.

12. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 11.

13. Культивируемая клетка, содержащая вектор по п. 12.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая (i) биспецифическое антитело по любому из пп. 1-10 или его антигенсвязывающую часть, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

15. Фармацевтическая композиция по п. 14, где первая тяжелая цепь и первая легкая цепь содержат соответствующие последовательности SEQ ID NO: 9 и 13.

16. Фармацевтическая композиция по п. 14 или 15, также содержащая дополнительное анти-HIV-1 антитело или его антигенсвязывающую часть.

17. Способ лечения инфекции ВИЧ-1, включающий идентификацию субъекта, нуждающегося в этом, и введение указанному субъекту первого терапевтического агента, содержащего терапевтически эффективное количество биспецифического антитела по любому из пп. 1-10 или его антигенсвязывающей части, или фармацевтической композиции по любому из пп. 14-16.

18. Способ по п. 17, где способ дополнительно содержит введение второго терапевтического агента.

19. Способ по п. 18, где второй терапевтический агент выбирают из группы, состоящей из ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы, ингибитора протеазы, ингибитора проникновения или слияния, ингибитора интегразы и второго анти-ВИЧ-1 антитела или его антигенсвязывающей части.

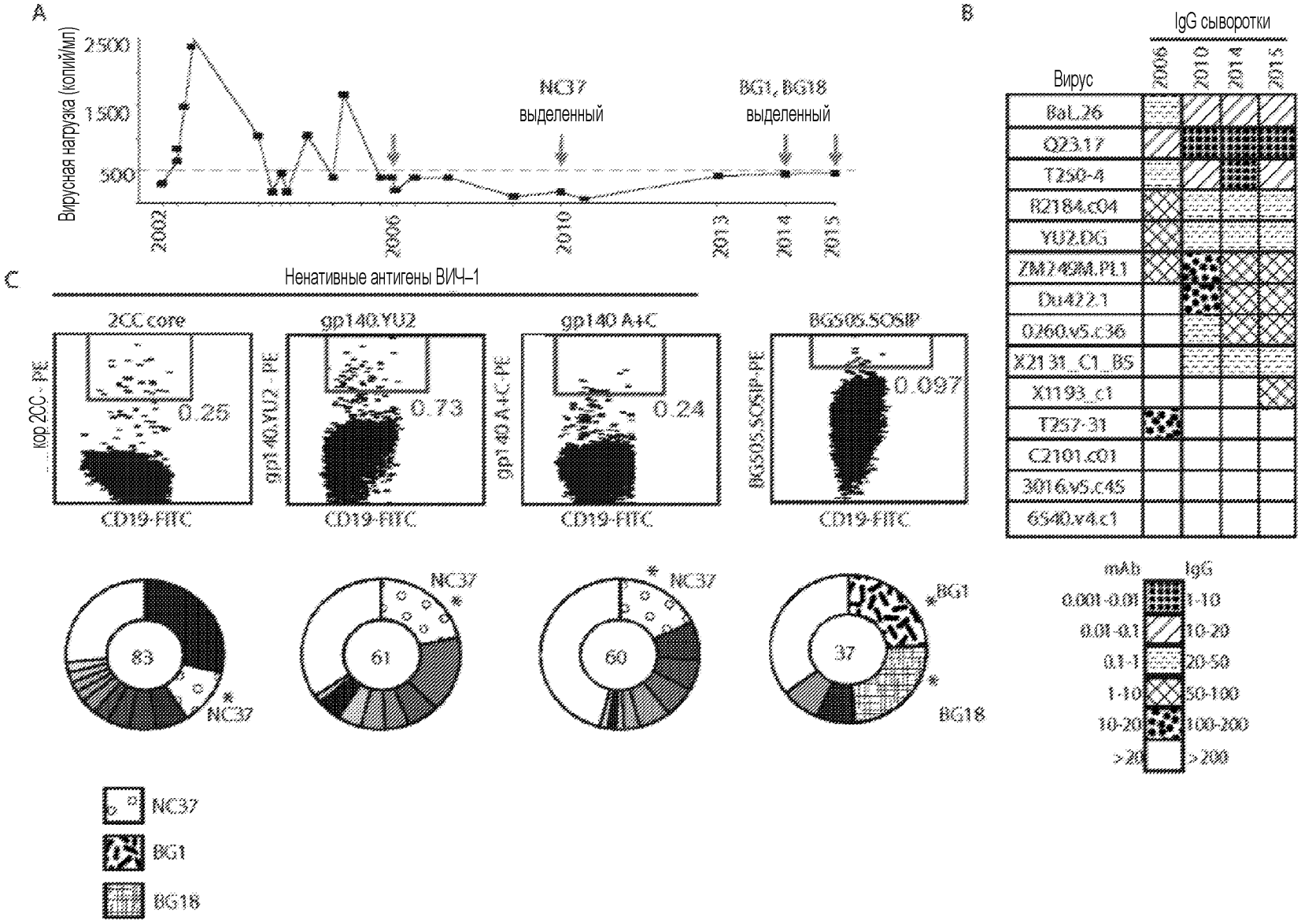
20. Вакцинная композиция, содержащая биспецифическое антитело по любому из пп. 1-10 или его антигенсвязывающую часть.

21. Вакцинная композиция по п. 20, где первая тяжелая цепь и первая легкая цепь содержат соответствующие последовательности SEQ ID NO: 9 и 13.

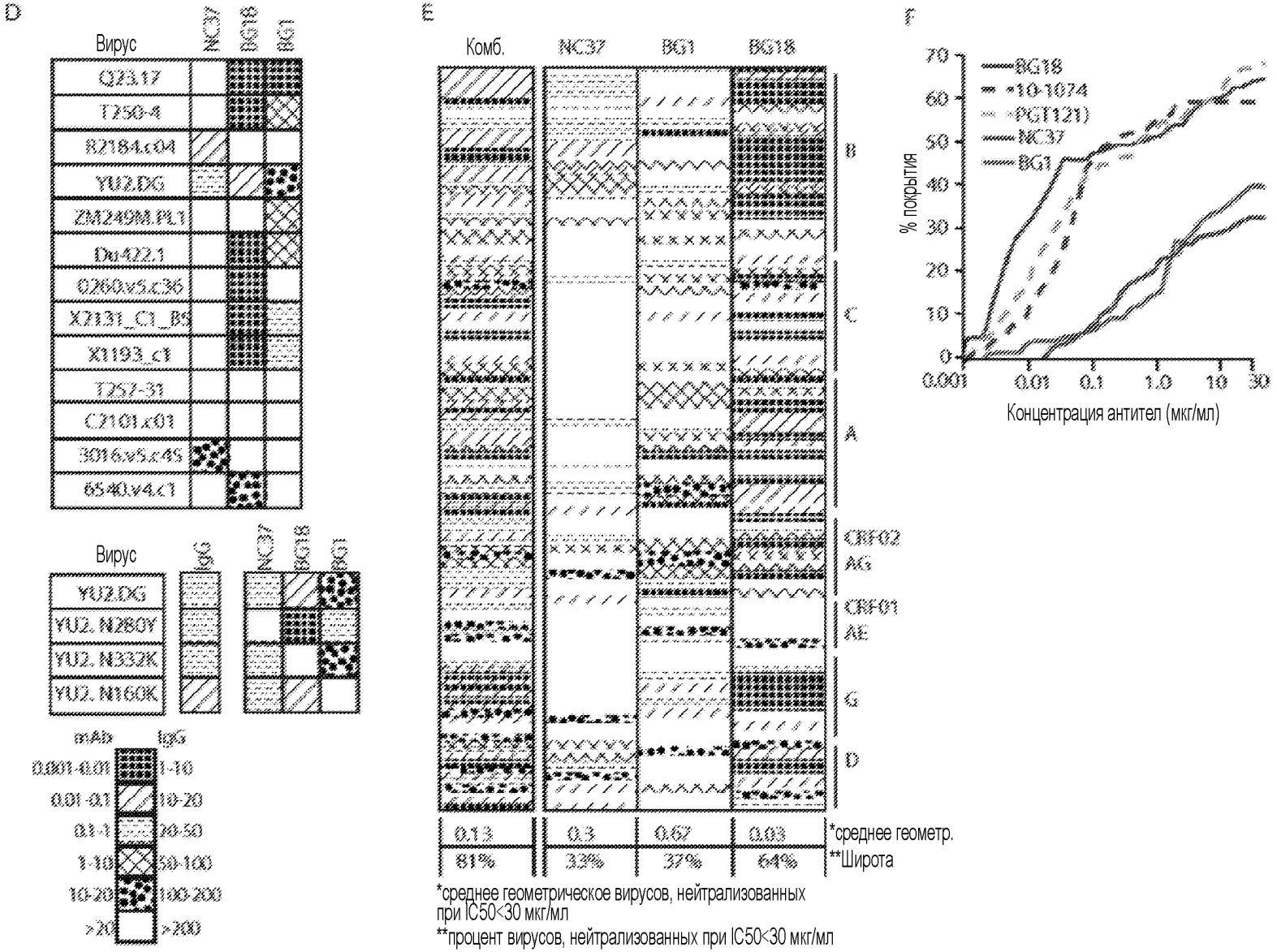
22. Способ профилактики инфекции ВИЧ-1 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту вакцинной композиции по любому из пп. 20-21.

По доверенности

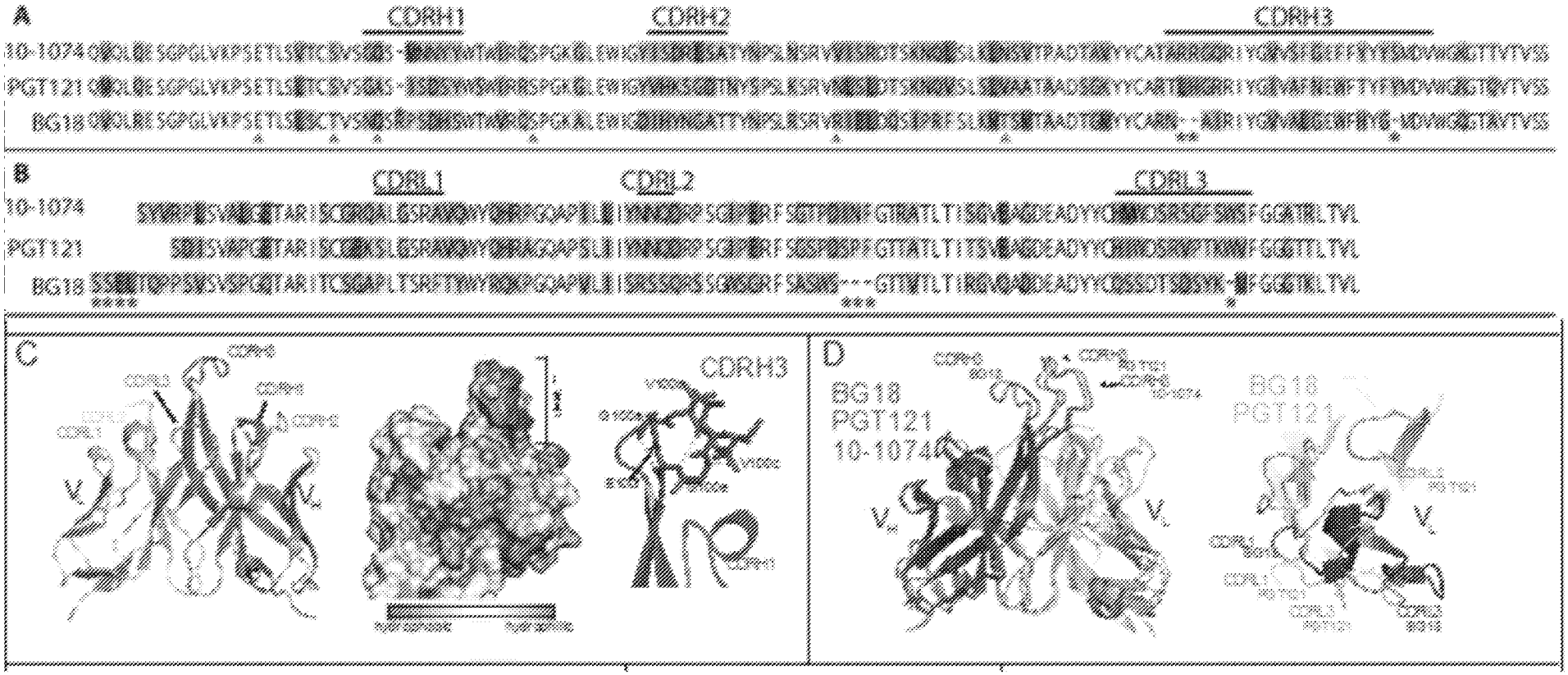
ФИГ. 1A, 1B, 1C


A
Вирусная нагрузка (копий/мл)
2500
1500
500
2002
2006
2010
2013
2014
2015
NC37
выделенный
BG1, BG18
выделенный
B
IgG сыворотки
Вирус
2006
2010
2014
2015
BaL.26
Q23.17
T250-4
R2184.c04
YU2.DG
ZM249M.PL1
Du422.1
0260.v5.c36
X2131_C1_B5
X1193_c1
T257-31
C2101.c01
3016.v5.c45
6540.v4.c1
mAb
IgG
0.001-0.01
0.01-0.1
0.1-1
1-10
10-20
>20
1-10
10-20
20-50
50-100
100-200
>200
C
Ненативные антигены ВИЧ-1
2CC core
gp140.YU2
gp140 A+C
BG505.SOSIP
кор 2CC - PE
gp140.YU2 - PE
gp140 A+C-PE
BG505.SOSIP-PE
CD19-FITC
0.25
0.73
0.24
0.097
83
61
60
37
NC37
BG1
BG18

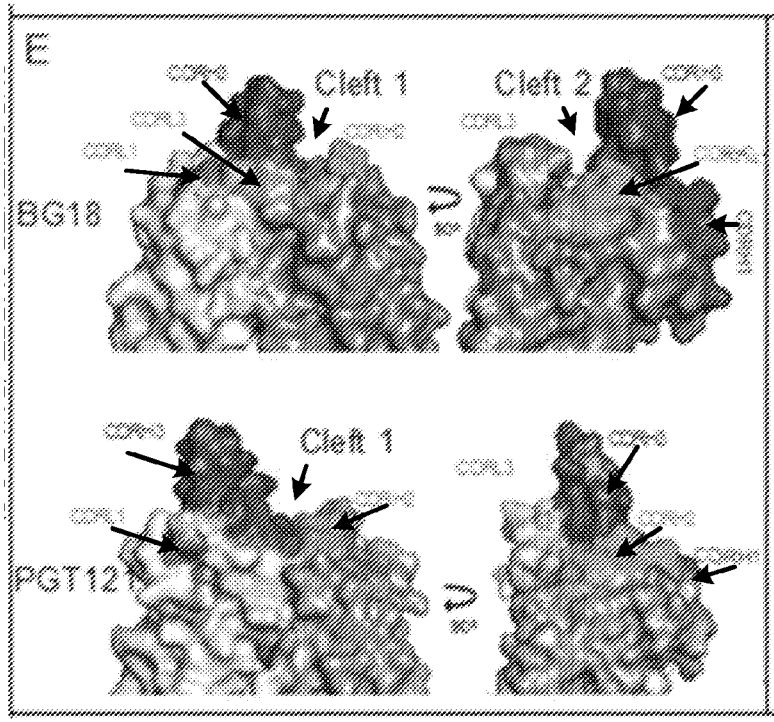
ФИГ. 1D, 1E, 1F


D
Вирус
NC37
BG18
BG1
Q23.17
T250-4
82184.c04
YU2.DG
ZM249M.PL1
Du422.1
Q260.v5.c36
X2131_C1_B5
X1193_c1
T257-31
C2101.c01
3016.v5.c45
6540.v4.c1
Вирус
YU2.DG
YU2. N280Y
YU2. N332K
YU2. N160K
mAb
IgG
0.001-0.01
0.01-0.1
0.1-1
1-10
10-20
>20
1-10
10-20
20-50
50-100
100-200
>200
E
Комб.
NC37
BG1
BG18
B
C
A
CRF02
AG
CRF01
AE
G
D
0.13
0.3
0.67
0.03
81%
32%
37%
64%
*среднее геометр.
**Широта
*среднее геометрическое вирусов, нейтрализованных при IC50<30 мкг/мл
**процент вирусов, нейтрализованных при IC50<30 мкг/мл
F
BG18
10-1074
PGT121
NC37
BG1
% покрытия
0
10
20
30
40
50
60
70
0.001
0.01
0.1
1.0
10
30
Концентрация антител (мкг/мл)

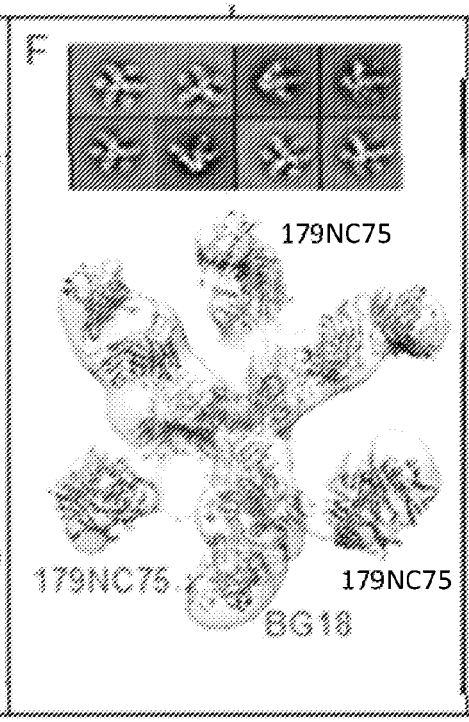
ФИГ. 2A, 2B, 2C, 2D



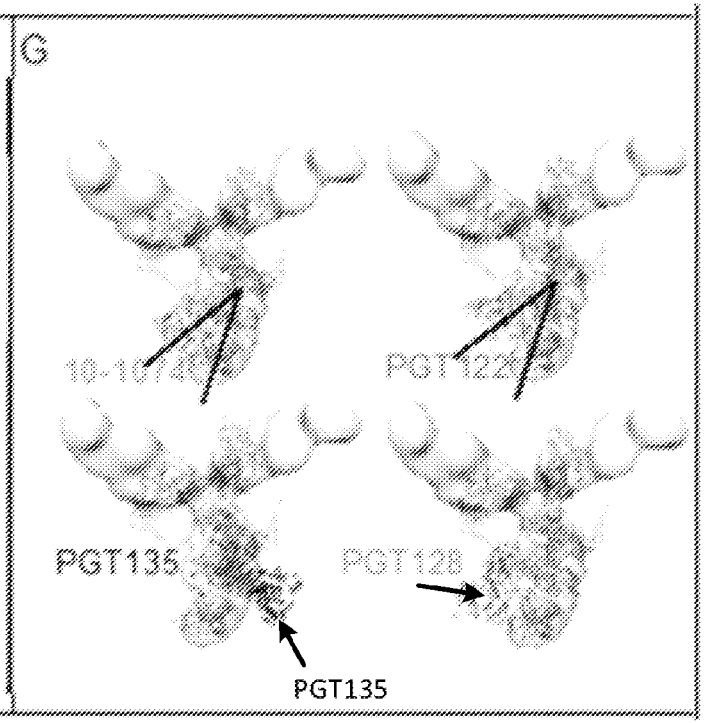
ФИГ. 2E



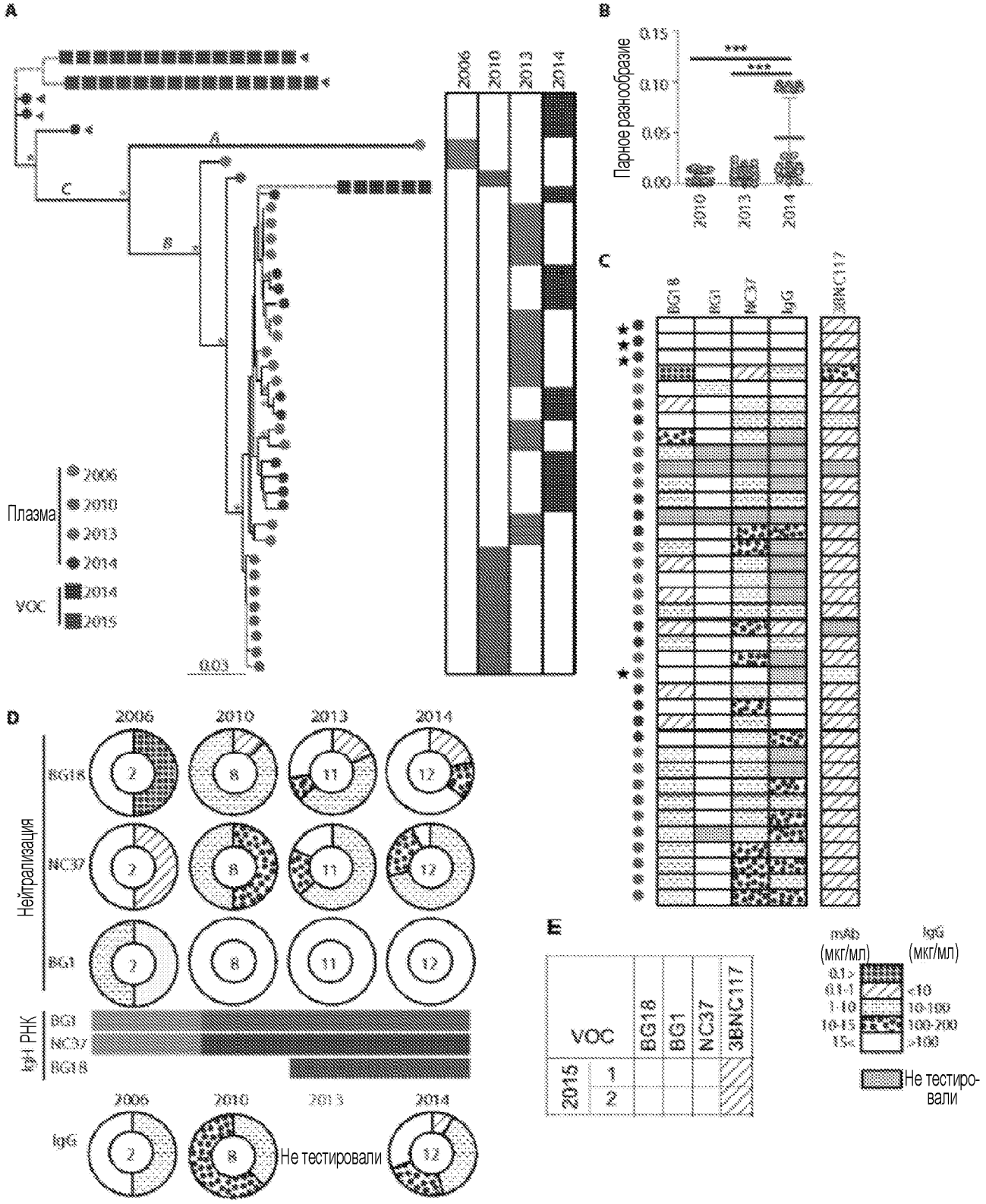
ФИГ. 2F



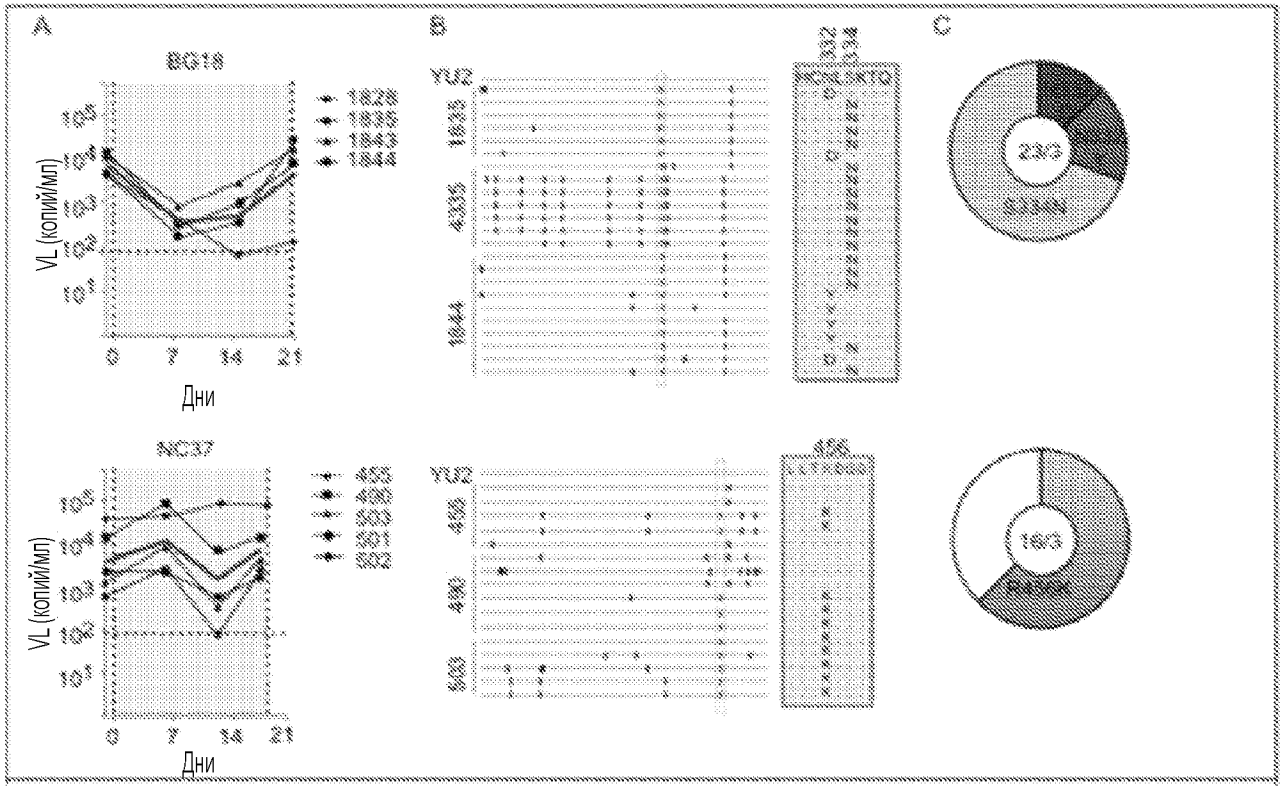
ФИГ. 2G



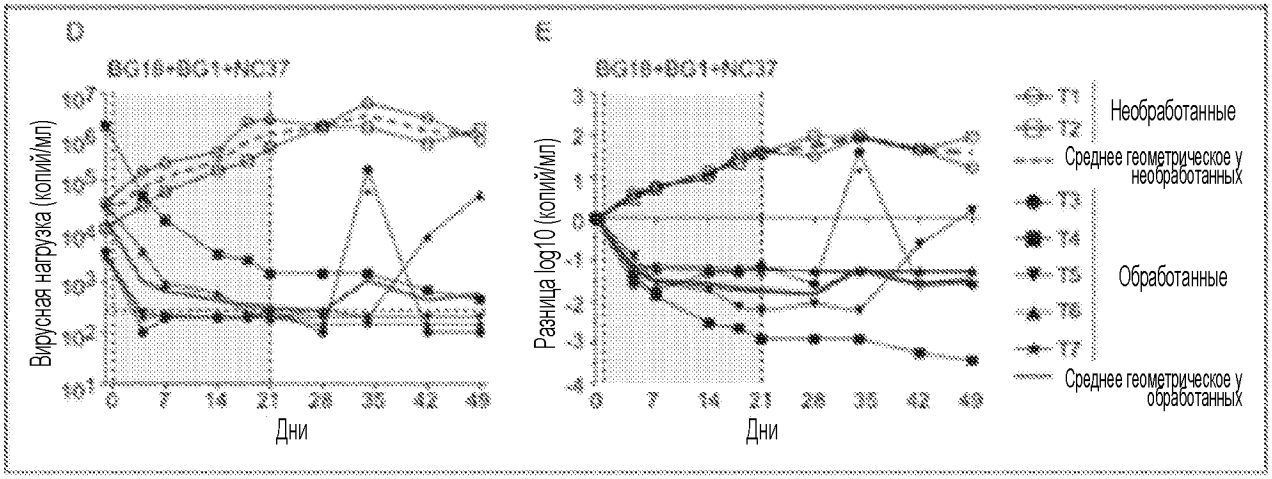
ФИГ. 3A, 3B, 3C, 3D, 3E



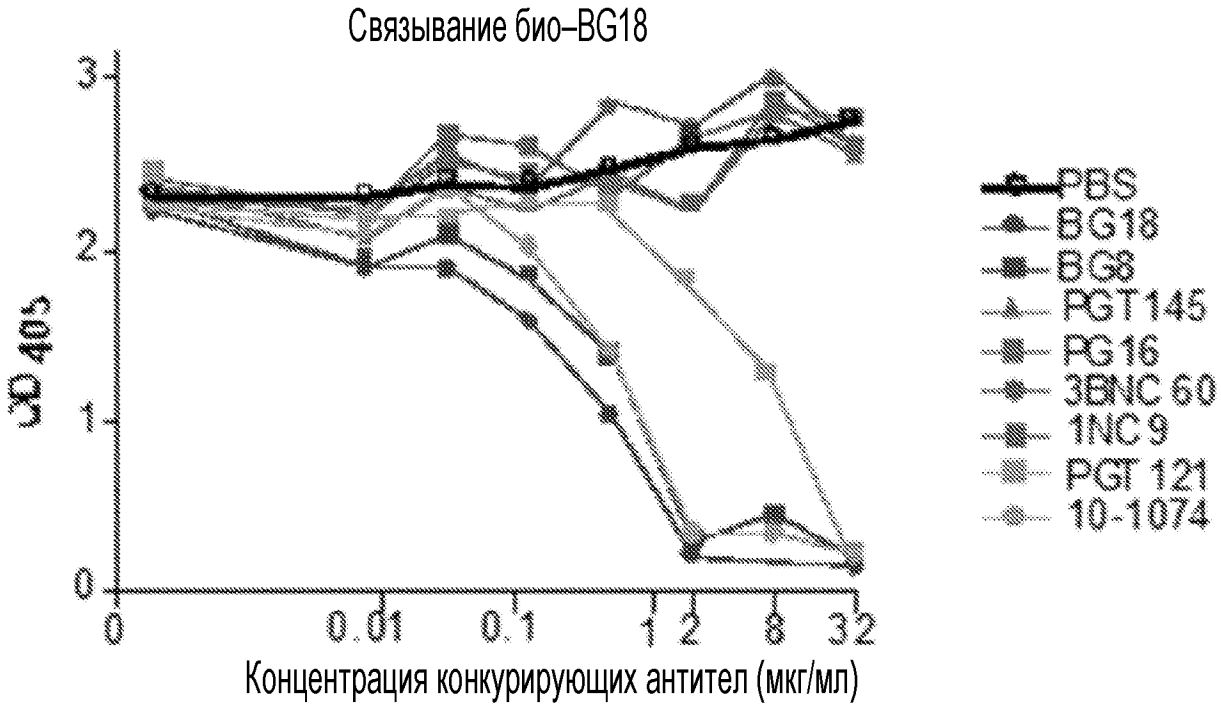
ФИГ. 4A, 4B, 4C

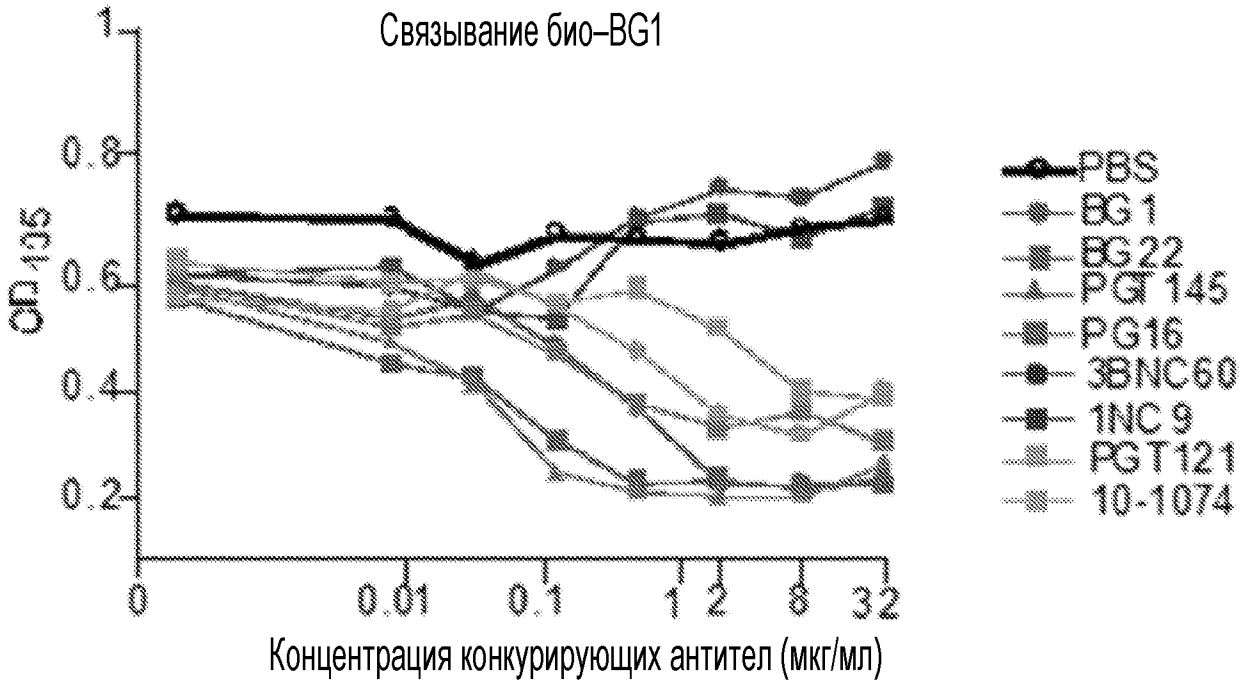


ФИГ. 4D, 4E

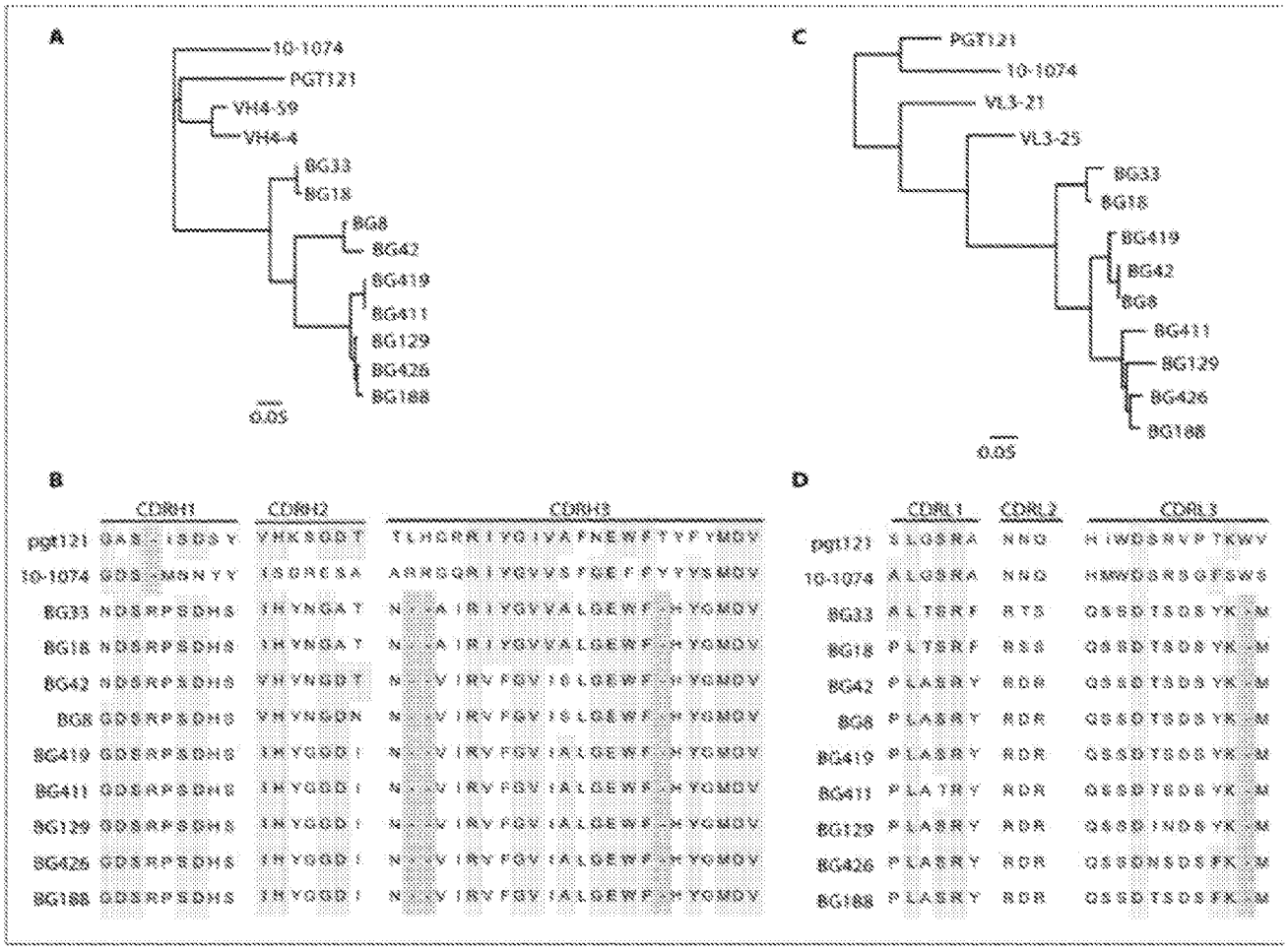


ФИГ. 5

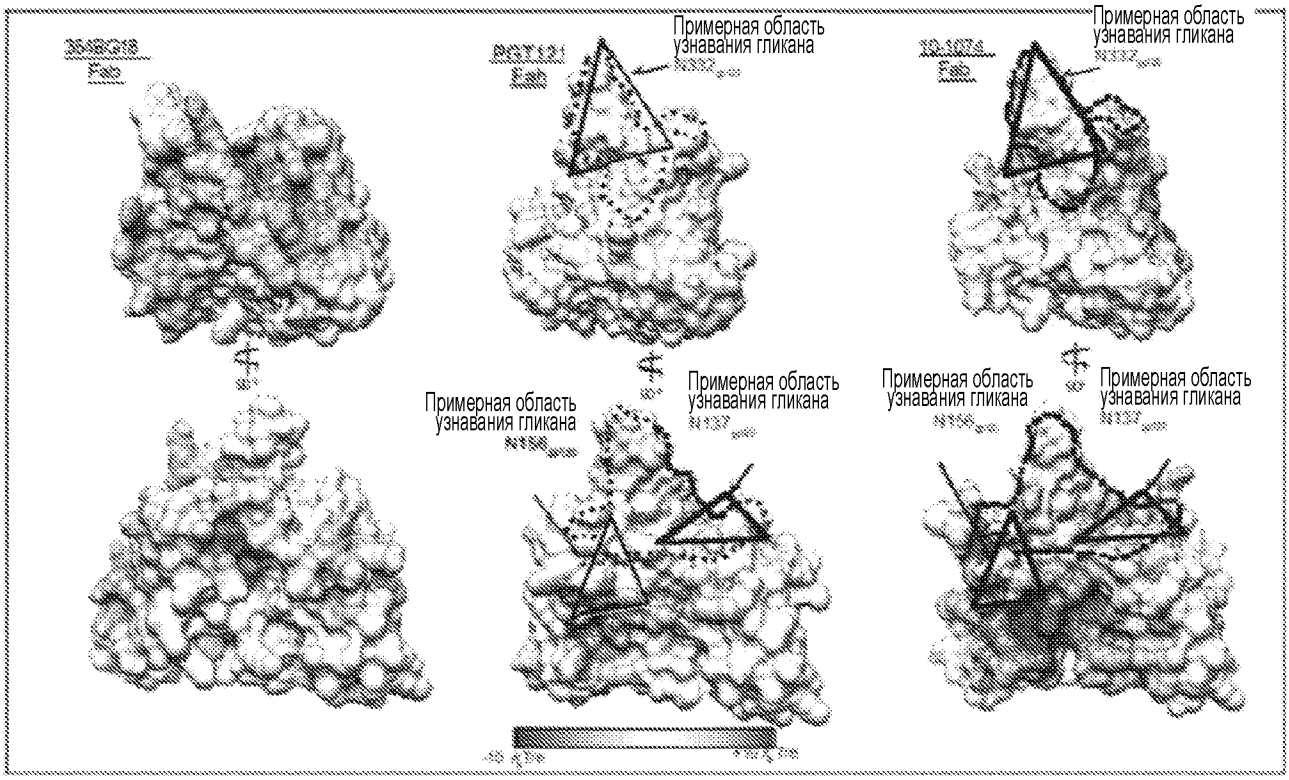

Связывание био–BG18
OD 405
3
2
1
0
0
0.01
0.1
1
2
8
32
Концентрация конкурирующих антител (мкг/мл)
PBS
BG18
BG8
PGT145
PG16
3BNC60
1NC9
PGT121
10-1074


Связывание био–BG1
OD 405
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.01
0.1
1
2
8
32
Концентрация конкурирующих антител (мкг/мл)
PBS
BG1
BG22
PGT145
PG16
3BNC60
1NC9
PGT121
10-1074

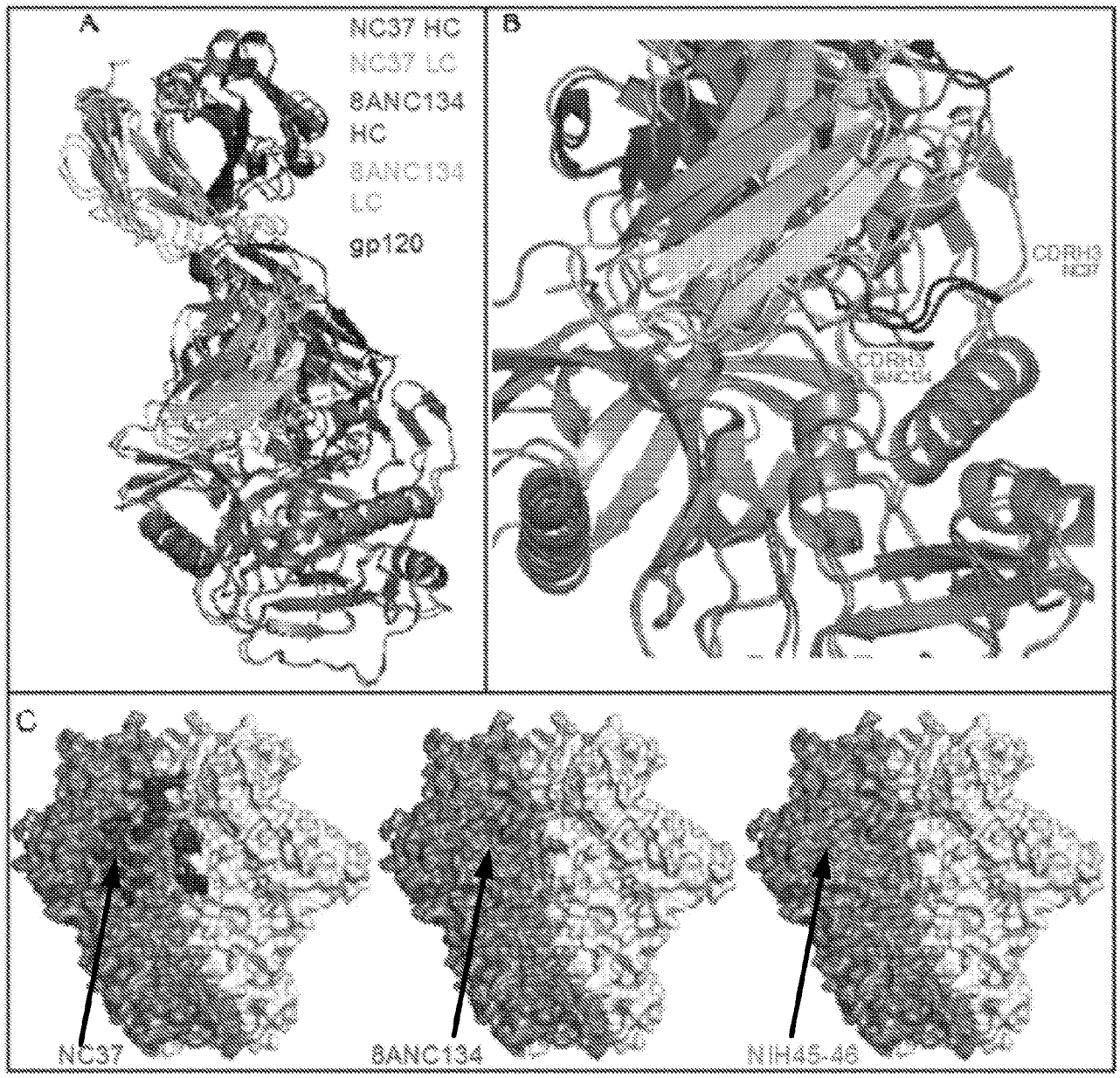
ФИГ. 6A, 6B, 6C, 6D



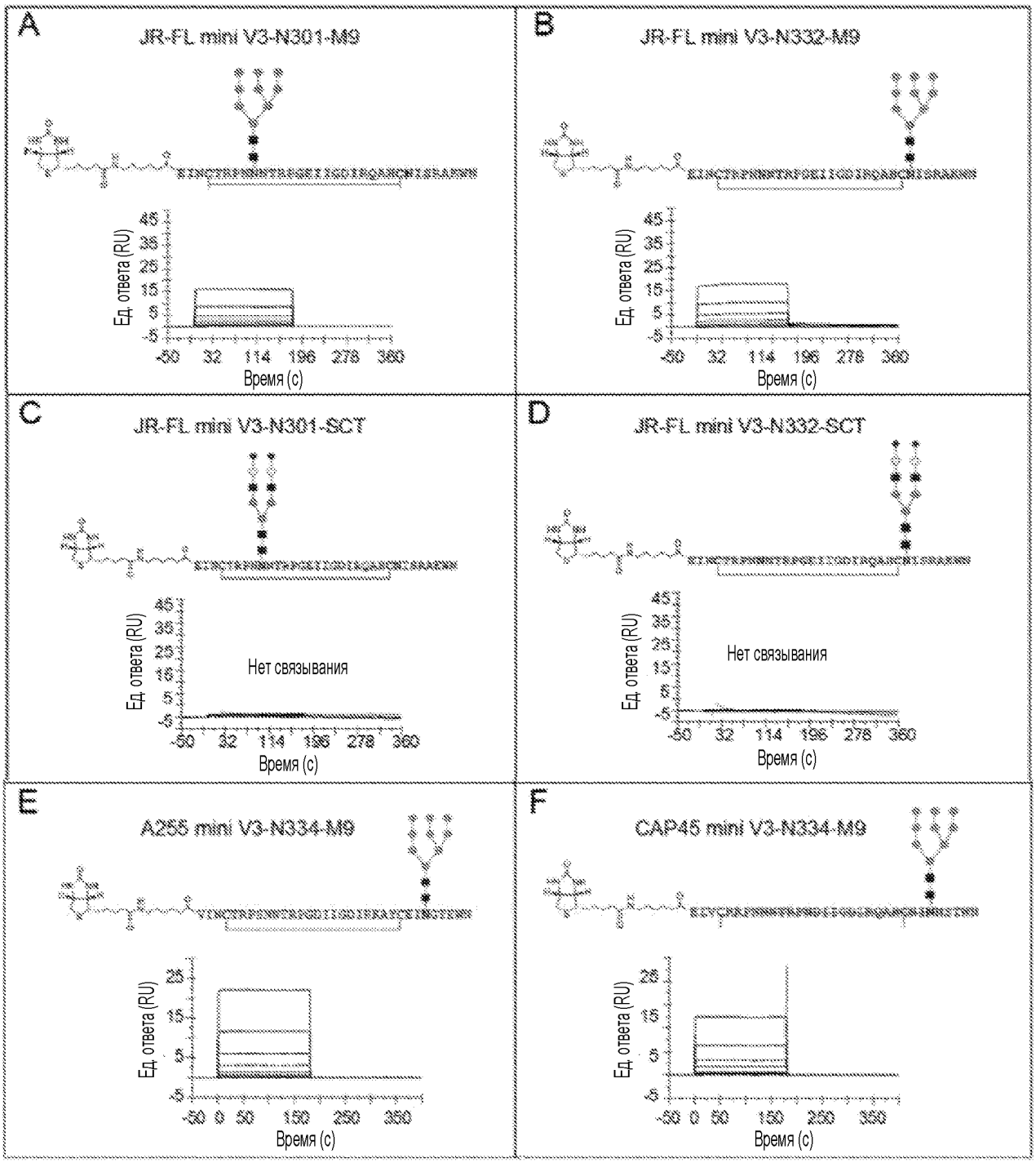
ФИГ. 7


Примерная область узнавания гликана
Примерная область узнавания гликана
Примерная область узнавания гликана
Примерная область узнавания гликана
Примерная область узнавания гликана
Примерная область узнавания гликана

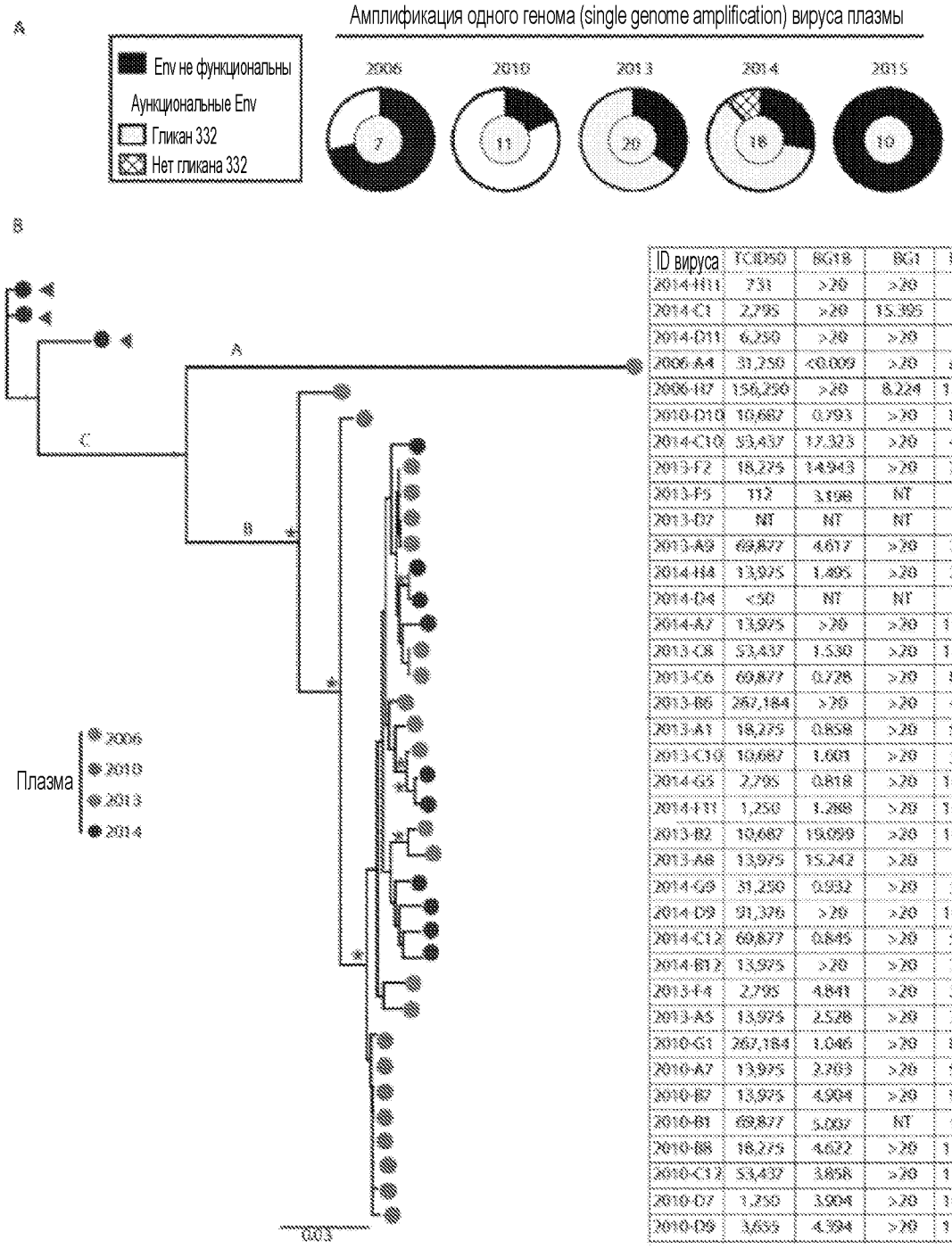
ФИГ. 8A, 8B, 8C


A
NC37 HC
NC37 LC
8ANC134 HC
8ANC134 LC
gp120
B
CDRH3 NC37
CDRH3 8ANC134
C
NC37
8ANC134
NIH45-46

ФИГ. 9A, 9B, 9C, 9D, 9E, 9F



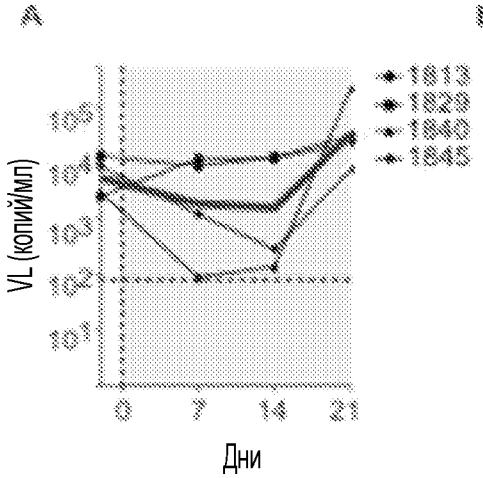
ФИГ. 10



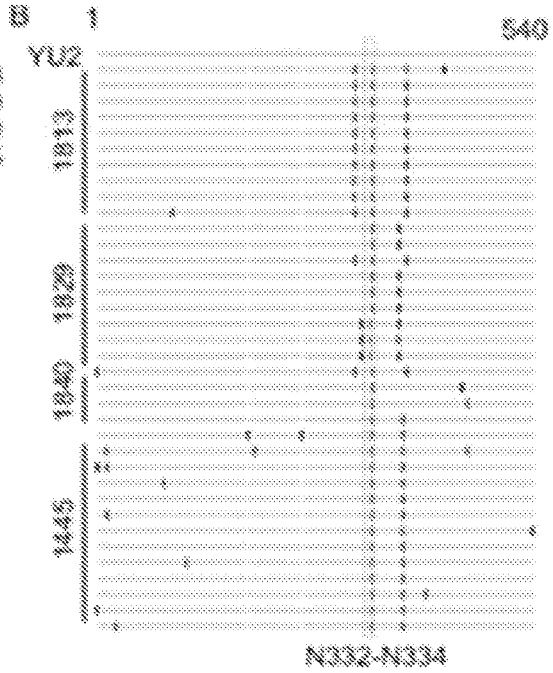
IC50 в клетках Tzm.bl

ID вируса	IC8050	8G18	8G1	8C37	bjG	38NC117
2014-H11	731	>20	>20	>20	>200	0.023
2014-C1	2,795	>20	15.395	>20	>100	0.110
2014-D11	6,250	>20	>20	>20	>100	0.078
2006-B4	31,250	<0.009	>20	0.579	73.67	18.153
2006-H7	156,250	>20	8.224	15.368	>200	0.104
2010-D10	10,687	0.793	>20	8.788	93.55	0.333
2014-C10	53,437	17.323	>20	4.634	98.31	2.211
2013-F2	18,275	14.943	>20	7.251	NT	0.215
2013-F5	113	3.158	NT	NT	NT	0.204
2013-D7	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2013-A3	69,877	4.617	>20	3.535	NT	0.498
2014-H4	13,975	1.485	>20	2.105	73.54	0.108
2014-D4	<50	NT	NT	NT	NT	NT
2014-A7	13,975	>20	>20	11.137	118.31	0.256
2013-C8	53,437	1.530	>20	14.042	NT	0.343
2013-C6	69,877	0.728	>20	8.124	NT	0.450
2013-B6	267,184	>20	>20	4.572	NT	0.434
2013-A1	18,275	0.858	>20	9.492	NT	0.476
2013-C10	10,687	1.003	>20	3.095	43.022	0.283
2014-G5	2,795	0.818	>20	10.012	22.747	NT
2014-F11	1,250	1.288	>20	16.417	73.69	0.141
2013-B2	10,687	19.089	>20	10.021	NT	0.307
2013-A8	13,975	15.242	>20	>20	NT	8.161
2014-G3	31,250	0.932	>20	3.235	23.022	0.237
2014-D9	91,376	>20	>20	10.741	>100	0.246
2014-C12	69,877	0.845	>20	5.500	136.43	0.183
2014-B12	13,975	>20	>20	3.841	112.43	0.072
2013-F4	2,795	4.841	>20	3.372	NT	0.160
2013-A5	13,975	2.528	>20	3.683	NT	0.094
2010-G1	267,184	1.046	>20	8.998	138.31	0.314
2010-A7	13,975	2.263	>20	9.293	81.31	0.323
2010-B7	13,975	4.904	>20	8.063	120.52	0.399
2010-B1	69,877	5.067	NT	1.926	167.07	0.412
2010-B8	18,275	4.622	>20	17.621	80.91	0.287
2010-C17	53,437	3.858	>20	13.546	112.43	0.446
2010-D7	1,250	3.904	>20	10.174	98.86	0.188
2010-D9	3,655	4.394	>20	12.893	101.11	0.280

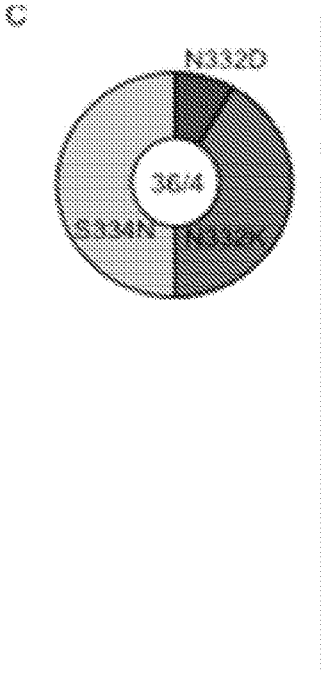
ФИГ. 11A



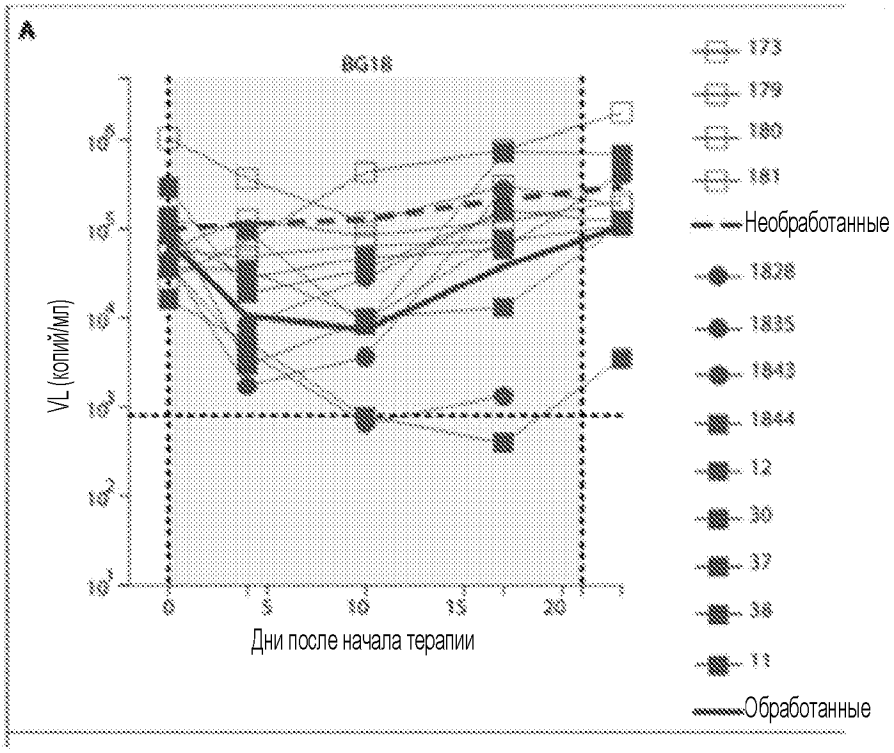
ФИГ. 11B



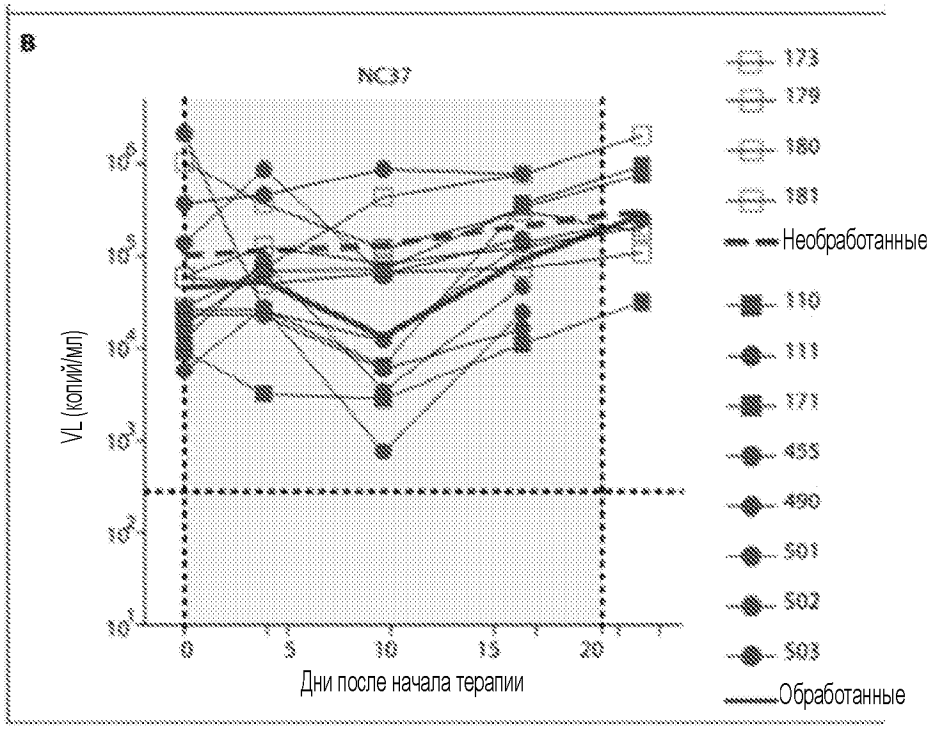
ФИГ. 11C



ФИГ. 12A



ФИГ. 12B



ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202390383

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

МПК:	СПК:
C07K 16/10 (2006.01)	**C07K 16/1045**
A61K 39/395 (2006.01)	**A61K 39/395**
A61P 31/18 (2006.01)	**A61P 31/18**

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C07K 16/10, A61K 39/395, A61P 31/18

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

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 91/00360 A1 (MEDAREX, INC.) 10.01.1991, реферат, формула	1-22
A	CN 106102837 A (AARON DIAMOND AIDS RES CENTER) 09.11.2016, реферат, формула	1-22
A	ASOKAN M. et al. Bispecific Antibodies Targeting Different Epitopes on the HIV-1 Envelope Exhibit Broad and Potent Neutralization. Journal of Virology, December 2015, Volume 89, Number 24, pp.12501-12512, реферат	1-22

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:
«A» - 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"

«T» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«Y» - 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: 25 октября 2023 (25.10.2023)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

Документ подписан электронной подписью
Сертификат: 1683140433539
Владелец: CN=Аверкиев С.
Действителен: 03.05.2023-02.05.2024

С.Е. Аверкиев