

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291372** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.08.05

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

(22) Дата подачи заявки
2020.11.06

(54) **ОЧИСТКА БЕЛКОВ**

(31) **62/932,180; 63/105,664**

(32) **2019.11.07; 2020.10.26**

(33) **US**

(86) **PCT/EP2020/081271**

(87) **WO 2021/089770 2021.05.14**

(88) **2021.07.01**

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

(72) Изобретатель:

**Полилли Брайан, Роде Кристофер,
Шреффлер Джон (NL)**

(74) Представитель:

**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) В данном документе описан способ очистки белка, в частности способ очистки гликопротеина, такого как белок оболочки HIV, пригодный для вакцин или биотерапевтических средств.

Стадия 1 Регулирование pH (предварительное сульфирование)
Стадия 2 Предсушка белка посредством периодического сульфирования с последующим биоферментом
Стадия 3 и 4 Флокулирование при низком значении pH и осветление
Стадия 5 Начальная UFDF
Стадия 6 Хроматография с колонкой Capto™ MMC ImpRes
Стадия 7 Хроматография с колонкой POROS™ HQ

Стадия 8 Хроматография с колонкой Capto™ DeVirS
Стадия 9 Инактивация вирусов при низком значении pH
Стадия 10 Хроматография с колонкой Capto™ Adhere
Стадия 11 Фильтрация с задержкой вирусов
Стадия 12 Ультрафильтрация/диализация
Стадия 13 Конечное составление

A1

202291372

202291372

A1

ОЧИСТКА БЕЛКОВ

5

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] Вирус иммунодефицита человека (HIV) поражает миллионы людей по всему миру, и предупреждение HIV с помощью эффективной вакцины по-прежнему имеет первостепенное значение даже в эпоху широкого распространения антиретровирусного лечения. Высокая генетическая изменчивость HIV-1 делает разработку вакцины против HIV-1 беспрецедентной задачей. С целью улучшения охвата потенциальных Т-клеточных эпитопов и улучшения клеточных ответов "мозаичные" антигены Gag, Pol и Env HIV-1, полученные из белков группового антигена (Gag), полимеразных белков (Pol) и белков оболочки (Env) HIV, были описаны другими авторами и разработаны в попытке обеспечить максимальный охват потенциальных Т-клеточных эпитопов (например, Barouch et al, *Nat Med* 2010, 16: 319-323); Мозаичные антигены сходны по длине и доменной структуре со встречающимися в природе антигенами HIV-1 дикого типа.

[0002] Эффективная вакцина против HIV может содержать один или несколько иммуногенных белков, которые сильно гликозилированы, например, с 20 или более сайтами гликозилирования. Некоторые из (гликозилированных) белков также могут быть значительно больше, чем стандартные моноклональные антитела, используемые в биотерапевтических средствах. Существует потребность в улучшенном способе получения и очистки белков, особенно гликозилированных иммуногенных белков, которые можно использовать в качестве активного ингредиента в вакцине или других фармацевтических композициях. Предпочтительно способ может улучшить выход, поддерживать конформационную стабильность представляющего интерес белка и быть легко адаптируемым к существующему оборудованию для крупномасштабного получения и/или очистки, обеспечивая при этом приемлемый общий выход и высокую чистоту белка.

[0003] Различные белки характеризуются различными свойствами, и, несмотря на множество различных возможных способов очистки, которые были описаны для различных белков, по существу невозможно предсказать, какой способ очистки будет соответствовать указанным выше требованиям для конкретного белка.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Настоящее изобретение относится к способу очистки белка, предпочтительно гликозилированного белка, такого как антигенный белок вируса иммунодефицита человека (HIV), более предпочтительно белка оболочки HIV, такого как белки оболочки HIV-1 клады С, или мозаичного белка оболочки, такого как белок gp140 HIV, например, тримерный белок gp140 HIV клады С или тримерный мозаичный белок gp140 HIV.

[0005] В одном общем аспекте настоящее изобретение относится к способу очистки белка, такого как белок оболочки вируса иммунодефицита человека (HIV), включающему:

- a. получение клеточного образца, такого как клеточный супернатант, содержащий белок;
- b. доведение значения рН клеточного образца до приблизительно 5,0 для осаждения таким образом белков клетки-хозяина (HCP) в клеточном образце;
- c. удаление осажденных HCP из клеточного образца посредством глубинной фильтрации с получением фильтрата, содержащего белок, и
- d. очистку белка из фильтрата посредством хроматографии.

[0010] В некоторых вариантах осуществления белок оболочки HIV представляет собой gp140 HIV-1 клады С или мозаичный белок gp140.

[0011] В некоторых вариантах осуществления клеточный образец, такой как клеточный супернатант, получают из экспрессирующих рекомбинантный белок клеток-хозяев, таких как эукариотические клетки-хозяева, предпочтительно клетки-хозяева млекопитающих. В определенных вариантах осуществления клетки-хозяева продуцируют белок в процессе периодического культивирования с подпиткой в биореакторе. В определенных вариантах осуществления объем биореактора составляет от приблизительно 1 л до приблизительно 20000 л, например, от приблизительно 10 л до приблизительно 16500 л.

[0012] В определенных вариантах осуществления клетки-хозяева удаляются, например, посредством гравитационного осаждения или предпочтительно посредством центрифугирования, более предпочтительно непрерывного центрифугирования, перед доведением значения рН клеточного образца, такого как клеточный супернатант.

[0013] В определенных вариантах осуществления клетки-хозяева удаляются, например, посредством гравитационного осаждения или предпочтительно посредством

центрифугирования, более предпочтительно непрерывного центрифугирования, после доведения значения рН клеточного образца посредством флокулирования при низком значении рН.

5 **[0014]** В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает одну или несколько стадий ультрафильтрации и диафильтрации (UFDF). Например, после глубоинной фильтрации на стадии с) может следовать стадия ультрафильтрации и диафильтрации (UFDF).

10 **[0015]** В определенных вариантах осуществления белок представляет собой белок оболочки HIV, например, gp140 HIV-1 клады С или мозаичный gp140 HIV-1, и хроматография предусматривает стадию захвата с применением полимодалной смолы (также называемой смолой смешанного типа), предпочтительно обладающей свойствами гидрофобного взаимодействия и катионного обмена. Было обнаружено, что такие смолы позволяют получить хорошие результаты очистки. В определенных неограничивающих примерах полимодалная смола представляет собой Capto MMC
15 или Capto MMC ImpRes (коммерчески доступную от Cytiva). В определенных вариантах осуществления белок оболочки HIV загружается при определенных значениях концентрации солей и рН и элюируется в более чистой форме при повышенной по сравнению с условиями загрузки концентрации солей и повышенном значении рН.

20 **[0016]** В определенных вариантах осуществления частично очищенный белок оболочки HIV, который был элюирован с полимодалной смолы на стадии захвата, подвергается второй стадии процесса хроматографии, например, стадии ортогональной хроматографии. В определенных предпочтительных вариантах осуществления вторая стадия хроматографии предусматривает применение анионообменной смолы, такой как
25 слабая анионообменная смола (например, Capto DEAE) или предпочтительно сильная анионообменная смола (например, POROS 50 HQ). Предпочтительно белок оболочки HIV связывается с этой смолой и затем элюируется в более чистой форме, например, с применением для элюирования повышенной по сравнению с условиями загрузки концентрации солей.

30 **[0017]** В определенных вариантах осуществления фракция, содержащая белок оболочки HIV, подвергается 3-й стадии хроматографии с применением смолы, которая содержит лиганд сульфат декстрана, например, Capto DeVirS (катионная среда, которая, как известно, характеризуется свойствами, подобными аффинности, в отношении различных типов вируса). Белок оболочки HIV связывается с этой смолой и

может затем быть элюирован в более очищенной форме, например, с применением повышенной по сравнению с условиями загрузки этой смолы концентрации солей. Эта стадия является особенно пригодной, если белок представляет собой белок gp140 клады С.

5 **[0018]** В определенных вариантах осуществления стадия инактивации вируса при низком значении рН, например, выдерживание в течение приблизительно одного часа при значении рН приблизительно 3,5 и последующая фильтрация через фильтр с диаметром пор 0,45-0,2 микрометра, проводится после второй стадии хроматографии в том случае, если не используется смола с лигандом сульфатом декстрана, или после
10 третьей стадии хроматографии в том случае, если используется смола, которая содержит лиганд сульфат декстрана.

[0019] В определенных вариантах осуществления проводится четвертая стадия хроматографии (которая является третьей стадией хроматографии в тех случаях, если смола, которая содержит лиганд сульфат декстрана, описанная выше, не используется,
15 например, в случае мозаичного белка gp140), где фракция, содержащая оболочку HIV, полученная на предыдущей стадии хроматографии (либо второй, либо третьей стадии хроматографии, как описано выше), наносится на смолу смешанного типа, которая содержит анионообменные и гидрофобные функциональные группы, например, смолу Capto Adhere. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения
20 смола смешанного типа на этой стадии используется в режиме связывания и элюирования. В других вариантах осуществления настоящего изобретения эта смола используется в проточном режиме. Специалист в данной области техники способен выбрать условия, которые являются подходящими для любого способа применения такой смолы, например, на стадии окончательной очистки для очистки белка оболочки
25 HIV с учетом настоящего изобретения. Эта стадия хроматографии позволяет дополнительно уменьшить количество примесей, представляющих собой гексамеры и белки клеток-хозяев, в белке оболочки HIV, который предпочтительно предусматривает тримерный gp140 HIV-1.

[0020] В определенных вариантах осуществления очищенный белок оболочки HIV,
30 полученный на последней стадии хроматографии, описанной выше, подвергается стадии фильтрации с задержкой вирусов, например, с применением фильтра Virosart HS или Planova 20N.

[0021] В определенных вариантах осуществления очищенный белок оболочки HIV подвергается заключительной стадии UFDF. Полученный материал можно составлять в конечный состав на его основе, например, для применения в качестве вакцины.

[0022] Аспект настоящего изобретения представляет собой обеспечение способа очистки белка gp140 HIV-1, включающего захват белка на полимодальной смоле, обладающей свойствами гидрофобного взаимодействия и катионного обмена, и элюирование очищенной фракции с указанной смолы, где чистота белка gp140 HIV-1 значительно повышается по сравнению с белком в смеси, которую загружали на смолу в ходе стадии захвата. Такие полимодальные смолы являются особенно подходящими для очистки белка gp140 HIV-1.

[0023] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ очистки белка gp140 HIV-1, при этом способ включает стадии:

- i) получения композиции, содержащей белок gp140 HIV-1 и другие белки, являющиеся нежелательными, такие как белки клетки-хозяина, полученные из клетки-хозяина, в которой экспрессировался белок gp140 HIV-1;
- ii) захвата белка gp140 HIV-1 на полимодальной смоле, обладающей свойствами гидрофобного взаимодействия и катионного обмена, и элюирования очищенной фракции, содержащей белок gp140 HIV-1, с указанной смолы;
- iii) загрузки очищенной фракции, полученной на стадии ii), на анионообменную смолу для связывания белка gp140 HIV-1, и элюирования дополнительно очищенной фракции, содержащей белок gp140 HIV-1, с указанной смолы;
- iv) подвергания дополнительно очищенной фракции, полученной на стадии iii), воздействию смолы смешанного типа, которая содержит анионообменные и гидрофобные функциональные группы, и элюирования дополнительно очищенного белка gp140 HIV-1. В предпочтительных вариантах осуществления белок gp140 HIV-1 в данном способе представляет собой мозаичный белок gp140.

[0024] В определенных вариантах осуществления данного способа способ включает дополнительную стадию нанесения дополнительно очищенной фракции белка gp140 HIV-1, полученной на стадии iii), на смолу, которая содержит лиганд сульфат декстрана, и элюирование дополнительно очищенной фракции, содержащей белок gp140 HIV-1, с указанной смолы перед подверганием данной фракции стадии iv) данного способа. Эти варианты осуществления являются особенно применимыми, если белок gp140 HIV-1 представляет собой белок gp140 клады С.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0025] Вышеизложенное краткое описание, а также нижеследующее подробное описание настоящего изобретения будут более понятны при их рассмотрении в сочетании с прилагаемыми фигурами. Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, показанными на фигурах.

[0026] На фигуре 1А показан способ очистки белка, предусматривающий центрифугирование с последующими флокулированием при низком значении рН и глубинной фильтрацией, а также колоночную хроматографию (chrom № 1 в случае белка gp140 HIV-1 может, например, представлять собой стадию захвата с применением смолы смешанного типа, обладающей свойствами гидрофобного взаимодействия и катионного обмена); на фигуре 1В показано повышение мутности собранного белка в ходе кислотного осаждения;

[0027] На фиг. 2А и 2В показано, что с применением способа, проиллюстрированного на фиг. 2А, в очищенных продуктах достигали требуемые минимальные уровни белков клеток-хозяев (НСР) (фиг. 2В); для gp140 HIV-1 клады С примером колонок, используемых в ходе проиллюстрированных стадий хроматографии, является chrom №1 (стадия захвата с применением смолы смешанного типа, обладающей свойствами гидрофобного взаимодействия и катионного обмена), chrom №2 (анионообменная смола), chrom №3 (смола, которая содержит лиганд сульфат декстрана), chrom №4 (смола смешанного типа, которая обладает анионообменными и гидрофобными функциональными группами);

[0028] На фиг. 3 проиллюстрирована блок-схема способа очистки gp140 HIV-1 клады С, и

[0029] на фиг. 4 проиллюстрирована блок-схема способа очистки мозаичного белка gp140.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0030] Различные публикации, статьи и патенты процитированы или описаны в разделе "Предпосылки изобретения" и на протяжении всего описания; при этом каждый из этих литературных источников включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которое было включено в настоящее описание, предназначено для обеспечения контекста настоящего изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что любые или все из этих материалов образуют часть

предшествующего уровня техники относительно любых раскрытых или заявленных изобретений.

[0031] Если не определено иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понятно 5 специалисту средней квалификации в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В иных случаях определенные термины, используемые в данном документе, имеют значения, изложенные в описании. Все патенты, опубликованные заявки на патент и публикации патентов, цитируемые в данном документе, включены 10 посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены в данном документе. Следует отметить, что используемые в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

[0032] На всем протяжении данного описания и в нижеследующей формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово "содержать" и его варианты, такие 15 как "содержит" и "содержащий", будут пониматься как подразумевающие включение указанного целого числа, или стадии, или группы целых чисел или стадий, но без исключения любого другого целого числа, или стадии, или группы целых чисел или стадий. При применении в данном документе термин "предусматривающий" может быть заменен термином "содержащий" или "включающий", или иногда при 20 применении в данном документе данный термин может быть заменен термином "имеющий".

[0033] Используемая в данном документе фраза "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанные в пункте формулы изобретения. Используемая в данном документе фраза "состоящий в значительной степени из" не 25 исключает материалы или стадии, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики пункта формулы изобретения. Любой из вышеупомянутых терминов "предусматривающий", "содержащий", "включающий" и "имеющий", всякий раз, когда они используются в данном документе в контексте аспекта или варианта осуществления настоящего изобретения, может быть заменен термином "состоящий из" 30 или "состоящий в значительной степени из" для изменения объема настоящего изобретения.

[0034] Используемый в данном документе термин "приблизительно" при использовании в сочетании с числом относится к любому числу в пределах $\pm 10\%$,

например, $\pm 5\%$ или $\pm 1\%$ от указанного числа. Например, значение рН, составляющее приблизительно 5,0, означает любое значение рН в диапазоне 4,5-5,5 включительно.

[0035] Используемый в данном документе связующий термин "и/или" между несколькими перечисленными элементами понимается как охватывающий индивидуальные и комбинированные варианты. Например, если два элемента соединены с помощью "и/или", первый вариант относится к применимости первого элемента без второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента без первого. Третий вариант относится к применимости первого и второго элементов совместно. Любой из этих вариантов понимается как подпадающий под данное значение и, следовательно, удовлетворяющий требованию используемого в данном документе термина "и/или". Понятно, что одновременная применимость более чем одного из вариантов также понимается как подпадающая под данное значение и, следовательно, удовлетворяющая требованию термина "и/или".

[0036] Используемый в данном документе термин "субъект" означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, более предпочтительно человека, которому будут вводиться или были введены белок или вакцина согласно вариантам осуществления настоящего изобретения. Используемый в данном документе термин "млекопитающее" охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают без ограничения коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т. п., более предпочтительно человека.

[0037] Настоящее изобретение в целом относится к способу очистки белка, предпочтительно гликозилированного белка, более предпочтительно белка оболочки вируса иммунодефицита человека (HIV), такого как белок оболочки HIV-1 клады С или мозаичный белок оболочки HIV-1, при этом способ включает:

- a. получение клеточного образца, такого как клеточный супернатант, содержащий белок;
- b. доведение значения рН клеточного образца до приблизительно 5,0 для осаждения таким образом белков клетки-хозяина (HCP) в клеточном образце;
- c. удаление осажденных HCP из клеточного образца посредством глубинной фильтрации с получением фильтрата, содержащего белок, и
- d. очистку белка в фильтрате посредством хроматографии.

[0038] Предпочтительно клеточный образец представляет собой клеточный супернатант, содержащий секретлируемый клеткой белок. Клеточный образец также

может представлять собой клеточный лизат или обработанный клеточный лизат, содержащий продуцируемый клеткой белок. Такой лизат может быть получен, например, посредством разрушения мембраны клетки. Клеточный образец, пригодный для заявленного способа, можно получать с применением известных из уровня техники способов с учетом настоящего изобретения. Например, клеточный супернатант можно получать посредством подвергания культуры клеток центрифугированию для удаления клеток. Клеточный лизат можно получать посредством разрушения или лизиса клеток и удаления клеточного дебриса посредством центрифугирования. Клеточный супернатант или клеточный лизат можно использовать непосредственно или их можно дополнительно обрабатывать перед применением в заявленном способе.

Предпочтительно для получения клеточного образца, пригодного для заявленного способа, используется непрерывное центрифугирование для удаления продуцирующих клеток из биореактора.

[0039] В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева продуцируют белок в процессе периодического культивирования с подпиткой в биореакторе.

[0040] В определенных вариантах осуществления объем биореактора составляет от приблизительно 1 л до приблизительно 20000 л, например, от приблизительно 10 л до приблизительно 16500 л, например, от приблизительно 100 л до приблизительно 15000 л.

[0041] Значение рН клеточного образца, такого как клеточный супернатант, можно доводить, например, посредством добавления подходящего количества кислоты (например, 1 М уксусной кислоты) к клеточному образцу для осаждения белков клеток-хозяев (НСР) в клеточном образце. Этот процесс иногда также называется "флокулированием при низком значении рН". Предпочтительно значение рН клеточного образца доводится до приблизительно 5, например, приблизительно 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5 или любого промежуточного значения для осаждения белков клеток-хозяев (НСР) в клеточном образце, в то время как значительное количество представляющего интерес белка (например, gp140 HIV) в клеточном образце не осаждается. Другие белки в клеточном образце, такие как белки в среде для культивирования клеток, также можно осаждать при значении рН, составляющем приблизительно 5.

[0042] В некоторых вариантах осуществления в ходе процесса флокулирования при низком значении рН клеточный образец инкубируется при значении рН, составляющем приблизительно 5, в течение от приблизительно 15 минут до приблизительно 15 часов,

например, в течение приблизительно 0,5-12 часов, например, приблизительно 1-3 часов, например, приблизительно 3 часов, предпочтительно приблизительно 1 часа, для осаждения НСР.

5 **[0043]** В некоторых вариантах осуществления флокулирование при низком значении рН можно проводить после центрифугирования. В предпочтительных вариантах осуществления флокулирование при низком значении рН проводится перед центрифугированием.

10 **[0044]** Осажденные НСР из клеточного образца можно удалить посредством глубинной фильтрации с получением фильтрата, содержащего белок. Глубинные фильтры с различными типами наполнителей (один слой или множество слоев целлюлозы, полиакриловое волокно, диатомовая земля, диоксид кремния, активированный уголь и т. п.) и с различными степенями очистки можно использовать для глубинной фильтрации в заявленном способе с учетом настоящего изобретения в
15 данном документе. Примеры глубинных фильтров, пригодных для настоящего изобретения, включают без ограничения глубинные фильтры, доступные из коммерческих источников, такие как семейство Millistak+® и глубинные фильтры Clarisolve® от Millipore Sigma. В определенных вариантах осуществления для глубинной фильтрации используется глубинный фильтр, такой как Millistak+® C0HC, C0SP, CE35, CE50, D0HC, D0SP, DE, A1HC, B1HC, F0HC, X0HC, X0SP и т. п.
20 Подходящие буферы можно использовать для уравнивания глубинных фильтров перед применением и для промывки фильтров после того, как белок, собранный посредством кислотного осаждения (например, осажденные НСР и другие белки), был отфильтрован через глубинный фильтр. Предпочтительно значение рН буфера составляет приблизительно 5,0. Предпочтительно глубинный фильтрат подвергается
25 стерильной фильтрации с удалением любых контаминирующих микроорганизмов, например, с помощью фильтра с размером пор 0,45 мкм или меньше, предпочтительно 0,22 мкм.

[0045] В определенных вариантах осуществления стадия ультрафильтрации и
30 диафильтрации (UFDF) используется для удаления НСР и концентрирования представляющего интерес белка (например, gp140) до хроматографии или между стадиями хроматографии. Ультрафильтрация (UF) представляет собой часто используемый способ для концентрирования разбавленного продукта в потоке. Она позволяет разделять молекулы в растворе на основании размера пор в мембране или отсеки по молекулярной массе. Диафильтрация (DF) часто используется для замены

буфера в продукте на требуемый буфер (например, замены буфера для элюирования на буфер для конечного составления). При UF и DF обычно используется фильтрация в тангенциальном потоке, где подпитка течет параллельно по отношению к поверхности мембраны, а не перпендикулярно по отношению к поверхности. Можно использовать различные мембраны для UF/DF, включая, например, мембраны из ацетата целлюлозы, поливинилиденфторида (PVDF) и полиэфирсульфона (PES). В зависимости от требований мембраны, используемые при UF/DF, могут характеризоваться разными значениями отсеки по молекулярной массе (MWCO). Например, MWCO для UF/DF может составлять, например, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 кДа. В некоторых вариантах осуществления при UF/DF используются одна или нескольких плоских мембран, наложенных друг на друга. Способы UF/DF включают, например, обработку для дезинфекции и тестирование перед применением, уравнивание, концентрирование, диафильтрацию, извлечение продукта, очистку и тестирование после применения, а также хранение. Целостность системы для UF/DF может быть подтверждена с применением диффузионного теста. Буферы, подходящие для UF и/или DF, можно использовать для способа UF/DF с учетом настоящего изобретения. Например, значение pH буфера может составлять 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8 или 8,5. С учетом настоящего изобретения можно использовать различные значения скорости поперечного потока и скорости загрузки мембраны.

20 **[0046]** В некоторых вариантах осуществления в заявленном способе используются три или более стадии колоночной хроматографии. С учетом настоящего раскрытия в настоящем изобретении можно использовать подходящие колонки. Примеры таких колонок включают без ограничения колонки, описанные в вариантах осуществления и, например, проиллюстрированные на фиг. 3 и 4.

25 **[0047]** В одном варианте осуществления заявленный способ включает стадию захвата в ходе хроматографии с применением полимодальной смолы (также называемой смолой смешанного типа). Полимодальные смолы и смолы смешанного типа для хроматографии содержат в своей основе наполнители, которые были функционализированы лигандами, способными по своей природе к нескольким различным типам взаимодействия, например, комбинациям двух или более из

30 ионообменного, аффинного, эксклюзивного и гидрофобного. Возможность объединять и использовать преимущества этих способов разделения белков может повысить общую селективность в процессе очистки. Эту повышенную селективность можно использовать для удаления технологических примесей за одну стадию

колоночной хроматографии, что в ином случае потребовало бы несколько стадий способа для удаления. Предпочтительно полимодальная смола обладает свойствами гидрофобного взаимодействия и катионного обмена, которые позволяют достичь большей устойчивости к солям, обеспечивая связывание белка со смолой с минимальным разбавлением или без него.

[0048] Смолы, применимые для настоящего изобретения, могут быть представлены в различных форматах, например, в виде гранул, фильтров (мембран), картриджей и т. п., все из которых должны рассматриваться как "смола" согласно настоящему изобретению, и в определенных вариантах осуществления смолы находятся в форме гранул, которые можно использовать в колонках, и смолы, которые можно использовать согласно настоящему изобретению, могут быть получены коммерчески от поставщиков, например, Cytiva (ранее GE Healthcare) и/или других. В некотором варианте осуществления полимодальная смола может представлять собой смолу, которая получена посредством прямой или непрямой иммобилизации двух или более типов функциональных групп, характеризующихся различной селективностью, на основной смоле. Например, полимодальная смола может содержать полимодальный материал для хроматографии с выраженными анионообменными свойствами, содержащий в качестве матрицы агарозу с высокой пропускной способности и полимодальный сильный анионообменник в качестве лиганда, или матрицу из агарозы с высокой пропускной способностью и полимодальный слабый анионообменник в качестве лиганда. Конкретные примеры полимодальной смолы могут включать без ограничения Capto Adhere, Capto MMC, Capto Adhere ImpRes или Capto MMC ImpRes (которые изготавливаются компанией Cytiva, Capto является зарегистрированной торговой маркой), HEA HyperCel, PPA HyperCel, MEP HyperCel (которые изготавливаются компанией Pall Corp., HyperCel является торговой маркой), TOYOPEARL (зарегистрированная торговая марка) MX-Trp-650M (изготавливается компанией TOSOH Corp.) или подобные смолы, без ограничения ими.

[0049] В определенных вариантах осуществления полимодальная хроматография с захватом проводится в проточном режиме.

[0050] В предпочтительных вариантах осуществления полимодальная хроматография с захватом проводится в режиме связывания и элюирования.

[0051] Предпочтительно полимодальная хроматография с захватом проводится в режиме связывания и элюирования с целью удаления белков и ДНК клеток-хозяев. Представляющий интерес белок загружается на полимодальную смолу для захвата,

например, в колонку, при определенной концентрации солей и определенном значении рН, и связывается с колонкой, а затем позднее элюируется элюирующим раствором с получением объединенного элюата. Представляющий интерес белок может быть загружен в колонку в любом подходящем буфере (таком как ацетатный буфер, гистидиновый буфер, буфер на основе HEPES, фосфатный буфер или буфер на основе Tris) и/или солевом растворе (таком как раствор хлорида натрия), например, в растворе, содержащем ацетат натрия при приблизительно 15-100 мМ (например, 25 мМ) и хлорид натрия при приблизительно 10-50 мМ (например, 25 мМ) при любом подходящем значении рН, таком как значение рН в диапазоне приблизительно 4-6 (например, рН 4 или 5), и с любой подходящей электропроводностью, такой как электропроводность в диапазоне приблизительно 1-50 мСм/см, например, приблизительно 3-50 мСм/см, например, приблизительно 5-50 мСм/см, например, приблизительно 3-40 мСм/см, например, приблизительно 6-40 мСм/см, предпочтительно приблизительно 3-20 мСм/см, например, приблизительно 10-20 мСм/см (например, приблизительно 5 мСм/см или приблизительно 15 мСм/см). Элюирующий раствор может содержать любой подходящий буфер (такой как буфер на основе 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этансульфоновой кислоты (HEPES)) и/или солевой раствор (такой как раствор хлорида натрия), например, раствор, содержащий HEPES при приблизительно 20-80 мМ (например, 50 мМ) и хлорид натрия при приблизительно 50-600 мМ, например, приблизительно 100-600 мМ (например, 400 мМ), и при любом подходящем значении рН, таком как значение рН в диапазоне приблизительно 4-8, например, приблизительно 4,5-7,5 (например, рН 7), и с любой подходящей электропроводностью, такой как электропроводность в диапазоне приблизительно 10-60 мСм/см (например, 40 мСм/см). Представляющий интерес белок также можно элюировать с полимодальной колонки для захвата посредством градиентного элюирования.

[0052] В другом варианте осуществления заявленный способ включает вторую стадию хроматографии, предусматривающую применение анионообменной смолы. Анионообменник, используемый на этой стадии, может представлять собой сильный анионообменник или слабый анионообменник. Предпочтительно анионообменник предусматривает анионообменный лиганд, такой как четвертичный аммоний, четвертичный аминоэтил, диэтиламиноэтил, триметиламиноэтил или диметиламиноэтил. Более предпочтительно анионообменник выбран из слабой анионообменной смолы (например, Capto DEAE) или сильной анионообменной смолы (например, POROS 50 HQ). Другие примеры анионообменника включают без

ограничения DEAE Sepharose FF, Q-Sepharose (HP и FF), AEX Sepharose FF (с низкой и высокой степенью замещения), Capto Q, Q XP, Source 30 Q и 15 Q, наиболее предпочтительно Fractogel DEAE и MPHQ.

5 **[0053]** В определенных вариантах осуществления вторая стадия хроматографии проводится в проточном режиме.

[0054] В предпочтительных вариантах осуществления вторая стадия хроматографии проводится в режиме связывания и элюирования.

10 **[0055]** Предпочтительно вторая стадия хроматографии проводится в режиме связывания и элюирования с целью дополнительного удаления белков и ДНК клеток-хозяев. Представляющий интерес белок загружается на анионообменную смолу, например, в колонку, при определенной концентрации солей и определенном значении рН, и связывается с колонкой, а затем позднее элюируется элюирующим раствором с получением объединенного элюата. Представляющий интерес белок может быть
15 загружен в колонку в любом подходящем буфере (таком как буфер на основе Tris или буфер на основе HEPES) и/или солевом растворе (таком как раствор хлорида натрия), например, в растворе, содержащем Tris при приблизительно 15-75 мМ (например, 25 мМ) и хлорид натрия при приблизительно 0-75 мМ, например, приблизительно 25-75 мМ (например, 50 мМ, или, например, 5 мМ), при любом подходящем значении рН, таком как значение рН в диапазоне приблизительно 6-8 (например, рН 7,5 или 8), и с
20 любой подходящей электропроводностью, такой как электропроводность в диапазоне приблизительно 2-8 мСм/см (например, 5,5 мСм/см). Элюирующий раствор может содержать любой подходящий буфер (такой как буфер на основе Tris) и/или солевой раствор (такой как раствор хлорида натрия), например, раствор, содержащий Tris при приблизительно 15-75 мМ (например, 25 мМ, или, например, 50 мМ) и хлорид натрия
25 при приблизительно 50-500 мМ, например, приблизительно 100-300 мМ (например, 185 мМ или 200 мМ), при любом подходящем значении рН, таком как значение рН в диапазоне приблизительно 6-9 (например, рН 7,5), и с любой подходящей электропроводностью, такой как электропроводность в диапазоне приблизительно 5-50 мСм/см, например, приблизительно 5-40 мСм/см (например, 20 мСм/см).
30 Представляющий интерес белок также может быть элюирован со второй колонки посредством градиентного элюирования.

[0056] В другом варианте осуществления заявленный способ включает третью стадию хроматографии с применением аффинной среды, которая связывается с гликаном. Смолы с аффинной средой могут содержать лиганд, представляющий собой

сульфат или декстрансульфат. Примеры аффинной среды включают без ограничения среду на основе сульфата целлюлозы или среду на основе сульфата агарозы, такую как сульфат целлуфина, сульфат целлуфина m, сульфат целлуфина c, сульфат целлулофина m, сульфат целлулофина c, сульфат целлуфина m или сульфат целлуфина c (которые
5 изготавливаются компанией JNC Corp.), Cytiva CAPTO™ Core 700 или Capto DeVirS (изготавливаются компанией Cytiva) или т. п.

[0057] В определенных вариантах осуществления третья стадия хроматографии проводится в проточном режиме.

10 **[0058]** В предпочтительных вариантах осуществления третья стадия хроматографии проводится в режиме связывания и элюирования.

[0059] Предпочтительно третья стадия хроматографии проводится в режиме связывания и элюирования с целью дополнительного удаления белков и ДНК клеток-хозяев. Представляющий интерес белок загружается на смолу с аффинной средой, например, в колонку, при определенной концентрации солей и определенном значении
15 рН, и связывается с колонкой, а затем позднее элюируется элюирующим раствором с получением объединенного элюата. Представляющий интерес белок можно загружать в колонку в любом подходящем буфере (таком как буфер на основе Tris или буфер на основе HEPES) и/или солевом растворе (таком как раствор хлорида натрия), например, в растворе, содержащем Tris при приблизительно 5-25 мМ (например, 6 мМ) или
20 HEPES при приблизительно 5-50 мМ (например, 20 мМ) и хлорид натрия при приблизительно 0-100 мМ, например, при приблизительно 25-75 мМ (например, 45 мМ или 50 мМ), и при любом подходящем значении рН, таком как значение рН в диапазоне приблизительно 4-8, например, приблизительно 5-8 (например, рН 6,5), и с любой подходящей электропроводностью, такой как электропроводность в диапазоне
25 приблизительно 1-15 мСм/см, например, приблизительно 1-10 мСм/см (например, 5 мСм/см). Элюирующий раствор может содержать любой подходящий буфер (такой как буфер на основе Tris) и/или солевой раствор (такой как раствор хлорида натрия), например, раствор, содержащий Tris при приблизительно 10-100 мМ, например, при приблизительно 15-75 мМ (например, 25 мМ), и хлорид натрия при приблизительно
30 100-300 мМ (например, 185 мМ), и при любом подходящем значении рН, таком как значение рН в диапазоне приблизительно 6-9 (например, рН 7,5), и с любой подходящей электропроводностью, такой как электропроводность в диапазоне приблизительно 10-30 мСм/см, например, приблизительно 15-25 мСм/см (например, 19

мСм/см). Представляющий интерес белок также может быть элюирован с третьей колонки посредством градиентного элюирования.

[0060] В определенных вариантах осуществления заявленный способ включает стадию инактивации вируса при низком значении рН, например, выдерживание в течение от приблизительно 15 минут до приблизительно 4 часов, например, приблизительно один час при значении рН, составляющем приблизительно 3-4, например, при значении рН, составляющем приблизительно 3,5, и последующую фильтрацию через фильтр с диаметром пор 0,45-0,2 микромметра. Эта стадия проводится после второй стадии хроматографии, если не используется третья стадия хроматографии с применением аффинной среды, или после третьей стадии хроматографии, если проводится третья стадия хроматографии. Фильтрат затем нейтрализуется до целевого значения рН, такого как значение рН, составляющее 5-7, перед следующей стадией обработки. Стадия инактивации вируса при низком значении рН может обеспечивать денатурацию белков контаминирующих вирусов, которые затем можно удалить посредством последующей колоночной хроматографии.

[0061] В другом варианте осуществления заявленный способ включает четвертую стадию хроматографии с применением полимодальной смолы, предпочтительно полимодальной смолы, содержащей функциональные группы, способствующие проведению анионообменной хроматографии и хроматографии гидрофобных взаимодействий. Конкретные примеры полимодальной смолы могут включать без ограничения Capto Adhere, Capto MMC, Capto Adhere ImpRes или Capto MMC ImpRes (которые изготавливаются компанией Cytiva, Capto является зарегистрированной торговой маркой), HEA HyperCel, PPA HyperCel, MEP HyperCel (которые изготавливаются компанией Pall Corp., HyperCel является торговой маркой), TOYOPEARL (зарегистрированная торговая марка) MX-Trp-650M (изготавливается компанией TOSOH Corp.) или подобные смолы, без ограничения ими. Подходящую полимодальную смолу, такую как Capto Adhere, можно использовать на этой стадии с учетом настоящего изобретения. Мультимодальная хроматография проводится в режиме связывания и элюирования или предпочтительно в проточном режиме. Четвертая стадия хроматографии позволяет дополнительно уменьшить количество примесей, представляющих собой гексамеры и белки клеток-хозяев, в пуле продуктов.

[0062] Предпочтительно четвертая стадия хроматографии проводится в проточном режиме с целью удаления белков и нуклеиновых кислот клеток-хозяев.

Представляющий интерес белок может быть загружен на смолу, например, в колонку, в

любом подходящем буфере (таком как буфер на основе ацетата натрия) и/или солевом растворе (таком как раствор хлорида натрия), например, в растворе, содержащем ацетат натрия при приблизительно 25-75 мМ (например, 50 мМ) и хлорид натрия при приблизительно 50-800 мМ, например, приблизительно 200-800 мМ (например, 317 мМ или 650 мМ), и при любом подходящем значении рН, таком как значение рН в диапазоне приблизительно 3-8, например, приблизительно 3-5 (например, рН 3,5 или 4,5), и с любой подходящей электропроводностью, такой как электропроводность в диапазоне приблизительно 5-70 мСм/см. Предпочтительно проточный раствор содержит белок Env HIV, например, белок gp140, в то время как некоторые примеси остаются связанными с колонкой.

[0063] В еще одном варианте осуществления заявленный способ включает одну или несколько стадий нанофильтрации (фильтрации с задержкой вирусов) и заключительную стадию UFDF. Фильтрация с задержкой вирусных частиц основана на эксклюзионном принципе. Например, для фильтрации с задержкой вирусов можно использовать вирусный фильтр с эффективным размером пор не более 75 нм. Примеры фильтров для фильтрации с задержкой вирусных частиц включают без ограничения Virosart HC, Virosart® HF, фильтр Planova 20N и т. п.

[0064] В еще одном варианте осуществления заявленный способ включает стадию конечного составления, где очищенный белок может быть составлен в конечный продукт, такой как вакцина или иммуногенная композиция. Конечные продукты по настоящему изобретению можно составлять в любой форме, подходящей для введения субъекту с целью облегчения введения и повышения эффективности, в том числе без ограничения для перорального (энтерального) введения и парентеральных инъекций.

[0065] Каждая из стадий хроматографии может быть проведена в подходящих условиях с учетом настоящего изобретения в данном документе. В определенных вариантах осуществления представляющий интерес белок, такой как белок оболочки HIV, загружается при определенных значениях концентрации солей и рН и элюируется в более чистой форме при повышенной по сравнению с условиями загрузки концентрации солей и повышенном значении рН.

[0066] Аспект настоящего изобретения представляет собой обеспечение способа очистки белка gp140 HIV-1, включающего захват белка на полимодалной смоле, обладающей свойствами гидрофобного взаимодействия и катионного обмена, и элюирование очищенной фракции с указанной смолы, где чистота белка gp140 HIV-1 значительно повышается по сравнению с белком в смеси, которую загружали на смолу

в ходе стадии захвата. Такие полимодальные смолы являются особенно подходящими для очистки белка gp140 HIV-1.

[0067] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ очистки белка gp140 HIV-1, при этом способ включает стадии:

- 5 i) получения композиции, содержащей белок gp140 HIV-1 и другие белки, являющиеся нежелательными, такие как белки клетки-хозяина, полученные из клетки-хозяина, в которой экспрессировался белок gp140 HIV-1;
- 10 ii) захвата белка gp140 HIV-1 на полимодальной смоле, обладающей свойствами гидрофобного взаимодействия и катионного обмена, и элюирования очищенной фракции, содержащей белок gp140 HIV-1, с указанной смолы;
- 15 iii) загрузки очищенной фракции, полученной на стадии ii), на анионообменную смолу для связывания белка gp140 HIV-1, и элюирования дополнительно очищенной фракции, содержащей белок gp140 HIV-1, с указанной смолы, и iv) подвергания дополнительно очищенной фракции, полученной на стадии iii), воздействию смолы смешанного типа, которая содержит анионообменные и гидрофобные функциональные группы, и элюирования дополнительно очищенного белка gp140 HIV-1.

[0068] В определенных вариантах осуществления белок gp140 HIV-1 представляет собой белок gp140 клады С или мозаичный белок gp140, предпочтительно мозаичный белок gp140.

20

[0069] В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию нанесения дополнительно очищенной фракции белка gp140 HIV-1, полученной на стадии iii), на смолу, которая содержит сульфат декстрана, и элюирование дополнительно очищенной фракции, содержащей белок gp140 HIV-1, с указанной смолы перед подверганием данной фракции стадии iv) данного способа.

25

Предпочтительно белок gp140 HIV-1 в этих вариантах осуществления представляет собой белок gp140 клады С.

[0070] Согласно заявленным вариантам осуществления способ по настоящему изобретению можно использовать как в лабораторном масштабе, так и в промышленном масштабе. Например, способ очистки белка можно использовать для получения очищенных белков gp140 HIV-1 для исследования. Заявленный способ также можно использовать в промышленном и крупном масштабе для получения больших количеств очищенных белков gp140 HIV-1, предпочтительно в тримерном состоянии. В частности, крупномасштабная очистка белка gp140 клады С может быть

30

достигнута с применением способа, описанного на фиг. 3, а крупномасштабная очистка мозаичного белка gp140 может быть достигнута с применением способа, описанного на фиг. 4.

5 **[0071]** Вирус иммунодефицита человека (HIV) является представителем рода *Lentivirinae*, который является частью семейства *Retroviridae*. Людей инфицируют две разновидности HIV: HIV-1 и HIV-2. HIV-1 представляет собой наиболее распространенный штамм вируса HIV и, как известно, является более патогенным, чем HIV-2. Используемые в данном документе термины "вирус иммунодефицита человека" и "HIV" относятся без ограничения к HIV-1 и HIV-2.

10 **[0072]** HIV подразделяется на несколько клад с высокой степенью генетической дивергенции. Используемые в данном документе термины "клада HIV" или "подтип HIV" относятся к родственным вирусам иммунодефицита человека, классифицированным согласно степени их генетического сходства. В настоящее время существуют три группы изолятов HIV-1: М, N и О. Группа М (главные штаммы) состоит из по меньшей мере десяти клад от А до J. Группа О (отдаленные штаммы) может состоять из аналогичного числа клад. Группу N представляет новый изолят HIV-1, который не был отнесен ни к одной из групп М или О.

15 **[0073]** Используемые в данном документе термины "антигенный полипептид HIV", "антигенный белок HIV", "антиген HIV" и "иммуноген HIV" относятся к полипептиду, способному индуцировать иммунный ответ, например, гуморальный и/или клеточноопосредованный ответ, на HIV у субъекта. Антигенный полипептид или антиген может представлять собой белок HIV, его фрагмент или эпитоп или комбинацию нескольких белков HIV или их частей, которые способны индуцировать иммунный ответ или обеспечивать выработку иммунитета, например, защитного иммунитета, к HIV у субъекта.

20 **[0074]** Предпочтительно антигенный полипептид или антиген способен вызывать в организме хозяина защитный иммунный ответ, например, индуцировать иммунный ответ на вирусное заболевание или инфекцию и/или обеспечивать выработку у субъекта иммунитета к вирусному заболеванию или инфекции (т. е. вакцинировать его), который защищает субъекта от вирусного заболевания или инфекции. Например, антигенный полипептид или антиген может предусматривать белок или его фрагменты из вируса иммунодефицита обезьян (SIV) или HIV, такой как белок gp160 оболочки HIV или SIV, белки матрикса/капсидные белки HIV или SIV и продукты генов *gag*, *pol* и *env* HIV или SIV.

[0075] Антигенный полипептид или антиген HIV может представлять собой любой антиген HIV-1 или HIV-2 или его фрагмент. Примеры антигенов HIV включают без ограничения продукты генов *gag*, *pol* и *env*, которые кодируют структурные белки и существенно важные ферменты. Продукты генов *gag*, *pol* и *env* синтезируются в виде полипротеинов, которые затем процессируются до нескольких других белковых продуктов. Основной белковый продукт гена *gag* представляет собой полипротеин *gag*, являющийся вирусным структурным белком, который дополнительно процессируется до белковых продуктов MA, CA, SP1, NC, SP2 и P6. Ген *pol* кодирует вирусные ферменты (Pol, полимеразу), и основной белковый продукт дополнительно процессируется до белковых продуктов RT, РНКазы H, IN и PR. Ген *env* кодирует структурные белки, в частности, гликопротеины оболочки вириона. Основной белковый продукт гена *env* представляет собой gp160, который дополнительно процессируется до gp120 и gp41. Другие примеры антигенов HIV включают белки Tat и Rev, регулирующие экспрессию генов; вспомогательные белки Nef, Vpr, Vif и Vpr; капсидные белки, нуклеокапсидные белки и вирусный белок p24.

[0076] В определенных вариантах осуществления антигенный полипептид или антиген HIV содержит антиген Gag, Env или Pol HIV или любую их антигенную часть или эпитоп или их комбинацию, предпочтительно антиген Gag, Env или Pol HIV-1 или любую их антигенную часть или эпитоп или их комбинацию.

[0077] Антигенные полипептиды HIV также могут представлять собой мозаичные антигены HIV. Используемый в данном документе термин "мозаичный антиген" относится к рекомбинантному белку, собранному из фрагментов природных последовательностей. Мозаичные антигены сходны с природными антигенами, но являются оптимизированными с целью максимизации охвата потенциальных T-клеточных эпитопов, обнаруживаемых в природных последовательностях, что улучшает спектр и охват иммунного ответа. Мозаичные антигены HIV могут, например, представлять собой мозаичные антигены Gag, Pol и/или Env, и более предпочтительно мозаичный антиген Env HIV-1. Как используется в данном документе, "мозаичный антиген Gag, Pol и/или Env HIV" относится, в частности, к мозаичному антигену, содержащему несколько эпитопов, полученных из одной или нескольких последовательностей полипротеинов Gag, Pol и/или Env HIV.

[0078] Каждый из используемых в данном документе терминов "белок оболочки HIV", "белок env" и "Env" относится к белку, который экспрессируется в оболочке вириона HIV и обеспечивает нацеливание HIV на плазматическую мембрану клеток,

инфицируемых HIV, и его прикрепление к ней, или к его фрагменту или производному, которые способны индуцировать иммунный ответ на HIV или обеспечивать выработку иммунитета к нему у субъекта, нуждающегося в этом. Ген *env* HIV кодирует белок-предшественник gp160, который подвергается протеолитическому расщеплению на два зрелых гликопротеина оболочки gp120 и gp41. Реакцию расщепления в последовательности, высококонсервативной среди предшественников гликопротеинов оболочки ретровирусов, опосредует протеаза фурин клетки-хозяина. Более конкретно, gp160 тримеризуется до (gp160)₃, а затем подвергается расщеплению на два нековалентно связанных gp120 и gp41. Проникновение вируса в клетку впоследствии опосредуется тримером из гетеродимеров gp120/gp41. Gp120 представляет собой рецепторсвязывающий фрагмент и связывается с CD4-рецептором на клетке-мишени, которая имеет такой рецептор, такой как, например, Т-хелперная клетка. Gp41, который нековалентно связан с gp120, представляет собой слитый фрагмент и обеспечивает вторую стадию, посредством которой HIV проникает в клетку. Gp41 изначально погружен в оболочку вируса, но когда gp120 связывается с CD4-рецептором, gp120 меняет свою конформацию, что приводит к тому, что gp41 становится доступным, и в этом случае он может способствовать слиянию с клеткой-хозяином. Gp140 представляет собой нерасщепленный эктодомен тримерного gp160, т. е. (gp160)₃, который был использован в качестве идентификатора нативного состояния расщепленного "шипа" вируса.

[0079] Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения "белок оболочки HIV" может представлять собой белок gp160, gp140, gp120, gp41, их комбинации, продукты слияния, усеченные варианты или производные. Например, "белок оболочки HIV" может предусматривать белок gp120, нековалентно связанный с белком gp41. Он также может предусматривать стабилизированный тримерный белок gp140, который может содержать тримеризационный домен, который стабилизирует тримеры gp140, или может быть модифицирован таким образом, чтобы содержать его. Примеры тримеризационных доменов включают без ограничения тримеризационный домен "фолдон" фибритина T4; суперспиральный тримеризационный домен, полученный из GCN4, и каталитическую субъединицу аспартаттранскарбамоилазы *E. coli* в качестве метки тримеризации. "Белок оболочки HIV" также может представлять собой усеченный белок оболочки HIV, в том числе без ограничения белки оболочки, содержащие С-концевое усечение в эктодоме (т. е. домене, который выступает во внеклеточное пространство), усечение в gp41, такое как усечение в

трансмембранном домене gp41 или усечение в цитоплазматическом домене gp41.

"Белок оболочки HIV" также может представлять собой производное встречающегося в природе белка оболочки HIV, содержащее мутации последовательности, например, в сайтах расщепления фурином, и/или так называемые мутации SOSIP. В

5 предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения белок оболочки HIV представляет собой белок gp140, более предпочтительно белок gp140 клады C HIV-1 или мозаичный белок gp140 HIV-1.

[0080] Каждый из используемых в данном документе терминов

10 "стабилизированный тримерный белок gp140" и "стабилизированный тример gp140" относится к тримеру из полипептидов gp140, который содержит полипептидную последовательность, которая повышает стабильность тримерной структуры.

Полипептиды gp140 могут содержать тримеризационный домен, который стабилизирует тримеры gp140, или могут быть модифицированы таким образом, чтобы содержать его. Примеры тримеризационных доменов включают без ограничения

15 тримеризационный домен "фолдон" фибритина T4; суперспиральный тримеризационный домен, полученный из GCN4, и каталитическую субъединицу аспартаттранскарбамоилазы *E. coli* в качестве метки тримеризации.

[0081] Примерами антигенных полипептидов оболочки HIV являются

стабилизированные тримерные gp140, такие как описанные в Nkolola et al 2010, *J. Virology* 84(7): 3270-3279; Kovacs et al, *PNAS* 2012, 109(30):12111-6; WO 2010/042942 и

20 WO 2014/107744, все из которых включены посредством ссылки во всей своей полноте.

[0082] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения "полипептид оболочки" или "гликопротеин оболочки" представляет собой мозаичный белок оболочки, содержащий несколько эпитопов, которые получены из одной или

25 нескольких последовательностей полипротеина Env одной или нескольких клад HIV.

Например, используемый в данном документе "белок gp140" может представлять собой "мозаичный белок gp140", который содержит несколько эпитопов, полученных из одной или нескольких последовательностей белка gp140 одной или нескольких клад HIV. Предпочтительно мозаичный белок gp140 представляет собой стабилизированный

30 тримерный белок gp140.

[0083] В предпочтительном варианте осуществления мозаичный белок gp140

представляет собой стабилизированный тример мозаичного белка gp140, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2.

[0084] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения "полипептид оболочки" или "гликопротеин оболочки" представляет собой белок оболочки, полученный из конкретной клады HIV, такой как клада А, В или С HIV. Например, используемый в данном документе "белок gp140" может представлять собой "белок gp140 клады С", который содержит последовательность белка оболочки, полученную из клады С HIV. Предпочтительно белок gp140 клады С представляет собой стабилизированный тримерный белок gp140 клады С.

[0085] В предпочтительном варианте осуществления белок gp140 клады С представляет собой стабилизированный тример белка gp140 клады С, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1.

[0086] Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения полипептид gp140, такой как стабилизированный тримерный белок gp140, можно вводить вместе с вирусными векторами экспрессии, например, аденовирусом 26 (см., например, WO 2016/049287, WO 2017/102929).

[0087] В определенных вариантах осуществления одному и тому же субъекту вводятся два белка gp140, предпочтительно gp140 клады С, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, и мозаичный gp140, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2. Эти два белка gp140 могут содержаться вместе в одной фармацевтической композиции, предпочтительно вводимой вместе с адъювантом, таким как адъювант на основе фосфата алюминия. Предпочтительная доза общего количества gp140 для введения людям находится в диапазоне от приблизительно 125 до 350 мкг, например, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350 мкг или любое количество между этими значениями, предпочтительно приблизительно 250 мкг. Если вводятся оба из gp140 клады С и мозаичного gp140, подходящая доза будет составлять, например, приблизительно 125 мкг каждого гликопротеина, чтобы обеспечить общую дозу гликопротеина gp140, составляющую 250 мкг, для введения субъекту-человеку. Как используется в данном документе, если не указано иное, количество полипептида gp140 относится к количеству полипептида gp140, измеренному в пересчете на количество гликопротеина.

[0088] Выделенный белок gp140 можно доставлять совместно или вводить в комбинации с аденовирусным (например, Ad26) вектором экспрессии или другим вектором экспрессии, таким как MVA. Согласно предпочтительному варианту осуществления белок gp140 и Ad26 или другой вектор экспрессии вводятся отдельно в

виде двух различных составов. В качестве альтернативы белок gp140 можно вводить вместе с Ad26 или другим вектором экспрессии в одном составе. Одновременное введение или совместная доставка могут иметь место в одно и то же время, в течение одного часа или в течение одного дня. Кроме того, белок gp140 можно вводить в составе с адъювантом. Подходящие адъюванты могут представлять собой, например, фосфат алюминия или адъювант на основе сапонины, предпочтительно адъювант на основе фосфата алюминия.

[0089] Антигенные полипептиды, такие как gp140, можно получать и выделять с применением любого способа, известного из уровня техники, с учетом настоящего изобретения. Например, антигенный полипептид можно экспрессировать с помощью клетки-хозяина, предпочтительно рекомбинантной клетки-хозяина, оптимизированной для продуцирования антигенного полипептида. Согласно варианту осуществления настоящего изобретения рекомбинантный ген используется для экспрессии белка gp140, содержащего мутации для устранения активности расщепления и слияния, предпочтительно оптимизированного белка gp140 с повышенным спектром, интенсивностью, глубиной или продолжительностью иммунного ответа на вирус (например, клеточных или гуморальных иммунных ответов), генерируемого после иммунизации (например, при включении в композицию, например, вакцину) субъекта (например, человека). Оптимизированный белок gp140 также может содержать мутацию(мутации) сайта расщепления, сайт фактора Ха и/или тримеризационный домен фолдон. Лидерная/сигнальная последовательность может быть функционально связана с N-концом оптимизированного белка gp140 для максимальной экспрессии белка. Лидерная/сигнальная последовательность обычно отщепляется от образующегося полипептида в ходе транспорта в люмен эндоплазматического ретикулума. Можно использовать любую лидерную/сигнальную последовательность, подходящую для представляющей интерес клетки-хозяина. Иллюстративная лидерная/сигнальная последовательность содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3.

[0090] Предпочтительно "белок оболочки HIV" представляет собой "синтетический белок оболочки HIV". Используемый в данном документе термин "синтетический белок оболочки HIV" относится к не встречающемуся в природе белку оболочки HIV, который оптимизирован для индукции иммунного ответа на один или несколько встречающихся в природе штаммов HIV или обеспечения выработки иммунитета к ним у субъекта, нуждающегося в этом. Мозаичные белки Env HIV являются примерами

синтетических белков Env HIV, и настоящее изобретение предусматривает синтетические антигены Env HIV, например, содержащие SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

5 **[0091]** Представляющий интерес белок, подлежащий очистке посредством способа согласно заявленному варианту осуществления, может быть экспрессирован клеткой-хозяином, предпочтительно рекомбинантной клеткой-хозяином. В определенных вариантах осуществления представляющий интерес белок, такой как белок оболочки HIV, может экспрессироваться с сигнальной последовательностью, и сигнальная последовательность отщепляется от образующейся полипептидной цепи в ходе ее

10 транспорта в люмен эндоплазматического ретикулума (ER). Можно использовать любую подходящую сигнальную последовательность. Предпочтительно используется сигнальная последовательность Env HIV или ее вариант. Из уровня техники известно применение различных сигнальных последовательностей для белков Env HIV (см., например, WO 2014/107744).

15 **[0092]** В предпочтительном варианте осуществления представляющий интерес белок рекомбинантным путем продуцируется клеткой-хозяином, трансфицированной вектором экспрессии, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок, такой как белок оболочки HIV. Для экспрессии рекомбинантного белка можно использовать любые подходящие векторы экспрессии, включая без

20 ограничения невирусные векторы, такие как плазмиды, космиды, бактериальные искусственные хромосомы, дрожжевые искусственные хромосомы, бактериофаги и т. п., или вирусные векторы, такие как аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированных вирусов, бакуловирусные векторы, поксвирусные векторы, векторы на основе MVA, энтеровирусные векторы, векторы на основе вируса венесуэльского энцефалита лошадей, векторы на основе вируса леса Семлики, векторы на основе вируса табачной мозаики, лентивирусные векторы и т. п.

25 **[0093]** Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая синтетический белок оболочки HIV, может быть функционально связана с промотором, что означает, что нуклеиновая кислота находится под контролем промотора. Промотор может

30 представлять собой гомологичный промотор (т. е. происходящий из того же источника генетического материала, что и вектор) или гетерологичный промотор (т. е. происходящий из другого вектора или источника генетического материала). Неограничивающие примеры подходящих промоторов для аденовирусных векторов предусматривают немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV) и промотор

вируса саркомы Рауса (RSV). Промотор предпочтительно расположен выше нуклеиновой кислоты, находящейся в касете экспрессии.

[0094] Клетка-хозяин обычно используется для получения значительных количеств белка для применения в настоящем изобретении.

5 **[0095]** Согласно предпочтительному варианту осуществления клетка из подходящей культуры клеток может быть трансформирована или трансфицирована вектором экспрессии. Любые клетки-хозяева, предпочтительно эукариотические клетки-хозяева, более предпочтительно клетки-хозяева млекопитающих, можно использовать для экспрессии рекомбинантного белка, включая без ограничения клетки
10 PER.C6, HEK293, CHO и т. п., трансфицированные вектором экспрессии, кодирующим представляющий интерес белок. Вектор экспрессии обычно также содержит касету, содержащую маркер и/или ген для отбора, которые облегчают идентификацию и выделение рекомбинантных клеток-хозяев, экспрессирующих представляющий интерес белок. Однако рекомбинантная клетка-хозяин также можно быть идентифицирована
15 посредством технологии ПЦР. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, которая кодирует рекомбинантный белок, например, белок оболочки HIV, встраивается в геном клетки-хозяина. Это позволяет получать рекомбинантный белок с помощью стабильной линии клеток-хозяев.

[0096] С учетом вырожденности генетического кода специалисту хорошо известно,
20 что можно сконструировать несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, которые кодируют один и тот же белок, согласно абсолютно рутинным способам из данной области техники. Нуклеиновую кислоту, кодирующую представляющий интерес белок, такой как белок оболочки HIV, можно необязательно подвергнуть оптимизации кодонов для обеспечения надлежащей экспрессии в клетке-хозяине.
25 Оптимизация кодонов представляет собой технологию, широко применяемую в данной области техники.

[0097] Соответственно, способ по настоящему изобретению может дополнительно включать получение представляющего интерес белка, такого как антигенный полипептид HIV, с помощью рекомбинантной клетки-хозяина. Предпочтительно
30 способ включает трансфекцию клетки-хозяина вектором экспрессии, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный полипептид HIV, функционально связанную с промотором, выращивание трансфицированной клетки в условиях, подходящих для экспрессии синтетического антигенного полипептида HIV, и выделение синтетического антигенного полипептида HIV из клетки с применением

способа по настоящему изобретению. Методики, используемые для экспрессии рекомбинантного белка, хорошо известны специалисту в данной области техники с учетом настоящего изобретения.

[0098] Другой общий аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, такой как вакцина или иммуногенная композиция, содержащая белок, очищенный посредством способа по настоящему изобретению, и носитель. Носитель может предусматривать одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, таких как связывающие вещества, разрыхлители, средства, способствующие набуханию, суспендирующие средства, эмульгирующие средства, смачивающие средства, смазывающие вещества, ароматизаторы, подсластители, консерванты, красители, солюбилизаторы и покрытия. Конкретная природа носителя или другого материала может зависеть от пути введения, например, внутримышечного, подкожного, перорального, внутривенного, чрескожного, интрамукозального (например, в кишечнике), интраназального или интраперитонеального путей. В случае жидких инъекционных препаратов, например, суспензий и растворов, подходящие носители и добавки предусматривают воду, гликоли, масла, спирты, консерванты, красящие средства и т. п. В случае твердых препаратов для перорального введения, например, порошков, капсул, каплет, желатиновых капсул и таблеток, подходящие носители и добавки предусматривают разновидности крахмала, сахара, разбавители, гранулирующие средства, смазывающие вещества, связывающие вещества, разрыхлители и т. п. В случае назальных спреев/смесей для ингаляции водный раствор/суспензия может содержать воду, гликоли, масла, смягчающие вещества, стабилизаторы, смачивающие средства, консерванты, душистые вещества, вкусоароматические добавки и т. п. в качестве подходящих носителей и добавок.

[0099] Композиции по настоящему изобретению можно составлять в любой форме, подходящей для введения субъекту с целью облегчения введения и повышения эффективности, в том числе без ограничения для перорального (энтерального) введения и парентеральных инъекций. Парентеральные инъекции предусматривают внутривенную инъекцию или инфузию, внутриартериальную инъекцию, подкожную инъекцию, внутримышечную инъекцию и внутрисуставную инъекцию. Композиции по настоящему изобретению также можно составлять для других путей введения, в том числе для чресслизистого, глазного, ректального введения, введения посредством имплантата длительного действия, сублингвального введения, введения "под язык",

введения через слизистую оболочку полости рта в обход портового кровообращения, ингаляционного или интраназального введения.

[00100] Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения композиция содержит иммуногенно эффективное количество белка, такого как белок оболочки HIV, очищенный посредством способа по настоящему изобретению, и
5 необязательно один или несколько дополнительных антигенов HIV и/или адъювантов. Указанные композиции можно составлять в виде вакцины (также называемой "иммуногенной композицией") согласно способам, известным из уровня техники, с учетом настоящего изобретения. Как правило, при применении в отношении
10 полипептида, такого как выделенный антигенный полипептид, иммуногенно эффективное количество может находиться в диапазоне, например, от приблизительно 0,3 до приблизительно 3000 микрограмм (мкг), например, 1-1000 мкг, например, 10-500 мкг, например, от приблизительно 50 мкг до 250 мкг.

[00101] В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему
15 изобретению могут дополнительно необязательно содержать адъювант для усиления иммунных ответов. Термины "адъювант" и "иммуностимулятор" используются в данном документе взаимозаменяемо и определяются как одно или несколько веществ, которые стимулируют иммунную систему. В данном контексте адъювант используется для усиления иммунного ответа на векторы, кодирующие синтетические белки
20 оболочки HIV по настоящему изобретению и необязательно один или несколько дополнительных антигенов HIV и/или антигенных полипептидов HIV, используемых в комбинации с векторами, кодирующими синтетические белки оболочки HIV по настоящему изобретению и необязательно один или несколько дополнительных антигенов HIV.

[00102] Адъюванты, подходящие для применения в настоящем изобретении, должны быть потенциально безопасными, хорошо переносимыми и эффективными у людей, такими как, например, QS-21, Detox-PC, MPL-SE, MoGM-CSF, TiterMax-G, CRL-1005, GERBU, TERamide, PSC97B, Adjuvant, PG-026, GSK-I, GcMAF, В-алетин, MPC-026, Adjuvant, CpG ODN, бетафектин, соли алюминия (например, AdjuPhos), Adjuvant и
30 MF59. Оптимальные доли каждого компонента в составе можно определить посредством методик, хорошо известных специалистам в данной области техники, с учетом настоящего изобретения.

[00103] В предпочтительном варианте осуществления адъювант представляет собой соль алюминия, такую как гидроксид алюминия или фосфат алюминия, например,

AdjuPhos. В определенных вариантах осуществления фосфат алюминия предпочтительно присутствует в композиции или вводится с композицией с выделенным антигенным полипептидом HIV, таким как gp140.

5 [00104] Получение и применение иммуногенных композиций хорошо известно специалистам в данной области техники. Жидкие фармацевтические композиции обычно содержат жидкий носитель, такой как вода, вазелин, масла животного или растительного происхождения, минеральное масло или синтетическое масло. Также могут быть включены физиологический солевой раствор, раствор декстрозы или другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или
10 полиэтиленгликоль.

[00105] В качестве альтернативы вакцины для прививок можно получить посредством постадийной лиофилизации вируса в составе. В определенных вариантах осуществления состав содержит дополнительные добавки, такие как маннит, декстран, сахар, глицин, лактоза, поливинилпирролидон или другие добавки, включая без
15 ограничения такие как антиоксиданты или инертный газ, стабилизаторы или рекомбинантные белки (например, сывороточный альбумин человека), подходящие для введения *in vivo*. Затем ампула герметично закрывается и может храниться при подходящей температуре, например, от 4°C до комнатной температуры, в течение нескольких месяцев. Однако до тех пор, пока нет необходимости, ампулу желательно
20 хранить при значениях температуры ниже -20°C.

[00106] В различных вариантах осуществления, предусматривающих вакцинацию или терапию, лиофилизат растворяется в 0,1-0,5 мл водного раствора, предпочтительно физиологического солевого раствора или буфера на основе трис(гидроксиметил)аминометана (Tris), и вводится либо системно, либо местно, т. е.
25 посредством парентерального, подкожного, внутривенного, внутримышечного, интраназального, внутрикожного или любого другого пути введения, известного практикующему специалисту. Оптимизация способа введения, дозы и количества введений находится в пределах компетенции и знаний специалиста в данной области техники.

30 [00107] В определенных вариантах осуществления белки оболочки HIV, такие как белки gp140, полученные посредством способов согласно настоящему изобретению, включены в композицию, содержащую сорбит (например, от 2 до 15% (вес/объем), например, 5% или 12%), полисорбат 20 (например, от 0,01 до 0,05% (вес/объем), например, 0,02%) и гистидиновый буфер (например, от 5 до 20 мМ, рН 5,5-7,0,

например, 10 мМ при рН 6,5), см., например, WO 2017/216288. Такие композиции могут необязательно дополнительно содержать адъювант, например, фосфат алюминия (например, 0,7-4,0 мг/мл, например, 0,7-1 мг/мл, например, 0,85 мг/мл). Белки оболочки HIV могут, например, присутствовать в концентрации, составляющей приблизительно 0,05-5 мг/мл, например, 0,2 мг/мл или 1 мг/мл. Такие композиции можно хранить, например, при температуре от приблизительно -80°C до приблизительно 25°C, например, при приблизительно -80°C, -60°C, -20°C или предпочтительно при приблизительно 2-8°C, что обеспечивает стабильные жидкие композиции, непосредственно пригодные для введения в качестве вакцин.

10 **[00108]** Настоящее изобретение также относится к способу индуцирования иммунного ответа на HIV одной или нескольких клас у субъекта, нуждающегося в этом, с применением фармацевтической композиции или вакцины по настоящему изобретению. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения "индукция иммунного ответа" при использовании в отношении способов и композиций, описанных в данном документе, охватывает обеспечение защитного иммунитета и/или
15 вакцинацию субъекта от инфекции, такой как HIV-инфекция, в профилактических целях, а также вызывание у субъекта, нуждающегося в этом, требуемого иммунного ответа или эффекта против инфекции, такой как HIV-инфекция, в терапевтических целях, т. е. терапевтическую вакцинацию. "Индукция иммунного ответа" также охватывает обеспечение терапевтического иммунитета для лечения, направленного против патогенного возбудителя, т. е. HIV. Для профилактической вакцинации, как правило, композиции и вакцины вводятся субъектам, которые ранее не были инфицированы HIV, тогда как для терапевтической вакцинации композиции и вакцины вводятся субъекту, уже инфицированному HIV. Иммунный ответ может представлять
20 собой клеточный иммунный ответ и/или гуморальный иммунный ответ.

[00109] Используемый в данном документе термин "защитный иммунитет" или "защитный иммунный ответ" означает, что вакцинированный субъект в состоянии контролировать инфекцию, вызываемую патогенным возбудителем, против которого была проведена вакцинация. Обычно у субъекта, у которого развился "защитный
30 иммунный ответ", развиваются клинические симптомы только от легкой до умеренной степени тяжести, или симптомы вообще не развиваются. Обычно субъект, имеющий "защитный иммунный ответ" на определенного возбудителя или "защитный иммунитет" к нему, не погибает в результате инфицирования указанным возбудителем.

[0100] Используемый в данном документе термин "терапевтический иммунитет" или "терапевтический иммунный ответ" означает, что инфицированный HIV вакцинированный субъект в состоянии контролировать инфекцию, вызванную патогенным возбудителем, т. е. HIV, против которого была проведена вакцинация. В определенных вариантах осуществления способы индуцирования иммунного ответа согласно настоящему изобретению предназначены для терапевтических целей, таких как терапевтическая вакцинация, при которой композиции и вакцины, описанные в данном документе, вводят субъекту, уже инфицированному HIV. Используемые в данном документе термины "HIV-инфекция" и "HIV-инфицированный" относятся к инвазии человека-хозяина HIV. Используемый в данном документе термин "HIV-инфицированный субъект" относится к субъекту, организм которого поражен HIV, и HIV впоследствии реплицировался и размножился в организме хозяина, вызывая таким образом инфицирование хозяина HIV или HIV-инфекцию или ее симптомы. В других вариантах осуществления белки и композиции по настоящему изобретению можно использовать для профилактической вакцинации, например, посредством введения субъекту, предпочтительно субъекту-человеку, который не инфицирован HIV.

[0101] Введение иммуногенных композиций, содержащих антигенный полипептид, осуществляется обычно внутримышечно, внутрикожно или подкожно. Однако также могут предусматриваться другие способы введения, такие как внутривенный, ректальный, чрескожный, пероральный, назальный и т. п. Внутримышечное введение иммуногенных композиций может быть достигнуто с применением иглы для инъекции суспензии антигенных полипептидов. Альтернативой является применение безыгольного устройства для инъекций для введения композиции (с применением, например, Biojector™) или лиофилизированного порошка, содержащего вакцину.

[0102] В случае внутримышечной, внутривенной, чрескожной или подкожной инъекции или инъекции в участок поражения антигенный полипептид, как правило, будет находиться в форме парентерально приемлемого раствора, характеризующегося подходящим значением pH, изотоничностью и стабильностью. Специалисты в данной области техники вполне способны получить подходящие растворы с применением, например, изотонических сред-носителей, таких как раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций и раствор Рингера с лактатом для инъекций. При необходимости можно включать консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки. Также можно применять состав с замедленным

высвобождением. Примеры подходящих составов для белков gp140 HIV представлены в WO 2017/216288, включенной в данный документ посредством ссылки.

[0103] Количество композиции, достаточное для индукции выявляемого иммунного ответа, определяется как "иммуногенно эффективная доза" или "иммуногенно эффективное количество". Фактическое вводимое количество, а также частота и продолжительность введения будут зависеть от природы и тяжести подлежащего лечению заболевания. Назначение лечения, например, принятие решений относительно дозировки и т. д., находится в пределах сферы ответственности врачей общей практики и других врачей или ветеринара в случае ветеринарной практики, и при этом, как правило, учитываются подлежащее лечению нарушение, состояние отдельного пациента, участок доставки, способ введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Примеры упомянутых выше методик и протоколов можно найти в общедоступных учебниках и руководствах.

15

ПРИМЕРЫ

[0104] Изучали процесс накопления клеточной массы в биореакторе и процесс выделения и очистки продукта для получения и очистки рекомбинантного белка (например, gp140 HIV клады С (SEQ ID NO: 1) или мозаичного gp140 HIV (SEQ ID NO: 2)), экспрессируемых рекомбинантными линиями клеток PER.C6. Несколько ростовых сред тестировали для улучшения экспрессии генов и продуктивности рекомбинантной клетки-хозяина в биореакторе. Например, подпитку в биореакторе концентрировали до 20%, что позволяет повысить продуктивность.

[0105] Изучали различные процессы, условия и колонки для очистки представляющего интерес белка (например, gp140 HIV клады С или мозаичного gp140 HIV) с целью, например, минимизации конечных уровней белков клеток-хозяев (НСР), поддержания уровня и/или конформации варианта продукта, удаления ДНК и других контаминантов, с сохранением при этом относительно высокого выхода (например, по меньшей мере приблизительно 10%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 15% от общего выхода). С применением способов по настоящему изобретению уровни НСР в конечном белковом продукте gp140 были снижены до менее 5000 ppm, обычно менее 1000 ppm, и уровень ДНК клеток-хозяев был ниже пределов выявления.

30

[0106] Вследствие высокой плотности клеток и типа рекомбинантных клеток-хозяев было трудно фильтровать собранные клетки. Основанное на гравитации осаждение

клеток нецелесообразно для крупномасштабного продуцирования представляющего интерес белка. Поэтому вместо стадии гравитационного осаждения использовали непрерывное центрифугирование.

[0107] Было отмечено, что осаждение после первой процедуры ультрафильтрации при подготовке к загрузке 1-й колонки для очистки (со смолой смешанного типа, обладающей свойствами гидрофобного взаимодействия и катионного обмена, которая, как было обнаружено, оказалась наиболее подходящей в колонке для захвата по причине широкого спектра возможностей). Кислотное осаждение (или флокулирование при низком значении pH) и глубинную фильтрацию использовали для удаления клеточного дебриса и других осадков при сохранении достаточного количества представляющего интерес белка (например, gp140 HIV) в фильтрате перед первой процедурой ультрафильтрации, чтобы избежать загрязнения фильтрующих мембран осадками. Было показано, что мутность осветленного собранного материала со значением pH, доведенным до 5,0 +/- 0,1 (например, с помощью 1 М уксусной кислоты), достигла плато при приблизительно 70 нефелометрических единицах мутности (NTU) через приблизительно 3 часа инкубации, но достигла более 95% от конечного значения, выраженного в NTU (см., например, фиг. 1A и 1B). Несмотря на то, что в ходе кислотного осаждения наблюдалось образование обильного осадка, выход выделенного рекомбинантного белка также был высоким, например, составлял приблизительно 100% для gp140 клады C, что свидетельствует о том, что в ходе кислотного осаждения gp140 клады C не выпадает осадок или не теряется, или выпадает в осадок или теряется минимальное его количество. Для подбора фильтров материалы, полученные в ходе кислотного осаждения, фильтровали через различные глубинные фильтры и после фильтрации снова измеряли мутность. Подходящие фильтры позволяли достичь значительного снижения мутности и удаления НСР, но без существенной потери рекомбинантного белка.

[0108] Ультрафильтрация (UF) и диафильтрация (DF) используются для концентрирования продукта и замены буфера перед разделением с помощью колонки (фиг. 1A). Посредством UF/DF осуществляли подготовку продукта для последующей стадии хроматографии. Колонки часто работают в условиях различных значений pH или молярности и продукт необходимо заранее подготовить для применения хроматографии посредством UF и DF. Подходящая процедура UF/DF может быть выбрана с учетом настоящего изобретения в заявке.

[0109] Способ по настоящему изобретению включает три или более стадий колоночной хроматографии, которым может предшествовать UF/DF продукта. Посредством способов скрининга с учетом непредсказуемости подходящей комбинации колонок для данного конкретного белка оценивали разные смолы с целью удовлетворения требований достаточного выхода и высокой чистоты в ходе крупномасштабного производственного процесса. Для оценки связывания примесей продукта получали изотермы связывания. Изучали и сравнивали разные колонки. Колонки с наибольшей связывающей способностью рассматривали как колонки для "захвата". С применением способа очистки, проиллюстрированного на фиг. 2А, достигали требуемого низкого уровня НСР (фиг. 2В).

[0110] Дополнительное улучшение способа осуществляли для оптимизации продуцирования в условиях изменения масштаба. Предпринимали усилия по разработке, направленные на соответствие оборудования требованиям и надежность способа. Такие усилия предусматривают, например, изменения подпитки, плотность засева, чувствительность к рН, температуру в биореакторе, изменение рСО₂, продолжительность работы реактора и т. д. Полупромышленный масштаб, модель меньшего масштаба и инженерные решения использовали для того, чтобы продемонстрировать готовность способа для продуцирования в условиях надлежащей производственной практики (GMP).

[0111] Отличные результаты были получены в случае очистки белка gp140 кланды С с применением способа, описанного на фиг. 3, и в случае очистки мозаичного белка gp140 с применением способа, описанного на фиг. 4. Эти способы оказались подходящими для крупномасштабного производства продуктов фармацевтической степени чистоты.

[0112] Пример 1. Очистка gp140 кланды С

[0113] gp140 кланды С получали посредством способа периодического культивирования клеток с подпиткой. Размножение клеток и продуцирование gp140 кланды С происходили на первых 2-х стадиях способа, включая стадию 1 (предварительное культивирование и применение биореактора для выращивания посевного материала), при которой используется линия клеток PER.C6, которая экспрессирует gp140 кланды С, и стадию 2 (продуцирование в биореакторе объемом от 15000 л до 16500 л). Последующая очистка и изготовление нерасфасованного препарата (FB) происходили на оставшихся 11 стадиях. Блок-схема способа

изготовления действующего вещества gp140 клады С, начиная с предварительного культивирования и размножения клеток и заканчивая действующим веществом (DS), показана на фиг. 3.

5 **[0114]** Целевая продолжительность процесса продуцирования в объеме 15000 л составляет 18 дней. Полученное содержимое реактора в объеме 15000 л затем подвергается флокулированию посредством доведения значения pH 25% уксусной кислотой до целевого значения pH 4,8 (стадия 3, флокулирование при низком значении pH). После флокулирования следует осветление (стадия 4) посредством центрифугирования и глубинной/окончательной фильтрации. Последующую стадию ультрафильтрации и диафильтрации (UFDF) (стадию 5) проводили в растворе, 10 содержащем 50 мМ трис(гидроксиметил)аминометана (Tris) и 150 мМ хлорида натрия при pH 7,6, с получением объединенного ретентата после UFDF.

15 **[0115]** На стадии 6 значение pH объединенного ретентата после UFDF довели 1 М уксусной кислотой до 5,0. Затем ретентат загружали в колонку Capto MMC ImpRes, которая уже была уравновешена раствором, содержащим 50 мМ ацетата натрия с pH 5,0. Данную процедуру колоночной хроматографии с применением колонки Capto MMC ImpRes проводили в режиме связывания и элюирования для удаления белков 20 клеток-хозяев и потенциально присутствующей ДНК. Связанный с колонкой gp140 клады С затем элюировали элюирующим раствором, содержащим 50 мМ 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]-этансульфоновой кислоты (HEPES) и 400 мМ хлорида натрия при pH 7,0, с получением объединенного элюата.

25 **[0116]** На стадии 7 объединенный элюат, собранный на вышеописанной стадии хроматографии с колонкой Capto MMC ImpRes, подвергали нейтрализации с помощью 1 М Tris (pH 9,0) до pH 7,5 и затем разбавляли водой для инъекций (до достижения 30 электропроводности менее 6 мСм/см). Полученный разбавленный элюат с доведенным значением pH загружали в колонку POROS 50 HQ, которая уже была уравновешена раствором, содержащим 25 мМ Tris с pH 7,5. Колоночную хроматографию с применением колонки POROS 50 HQ проводили в режиме связывания и элюирования для дополнительного удаления белков клеток-хозяев и потенциально ДНК. Связанный с колонкой gp140 клады С затем элюировали элюирующим раствором, содержащим 25 мМ Tris и 185 мМ хлорида натрия при pH 7,5 (электропроводность приблизительно 19 мСм/см), с получением объединенного элюата.

[0117] На стадии 8 значение pH объединенного элюата, собранного на вышеописанной стадии хроматографии с колонкой POROS 50 HQ, довели с

помощью 1 М уксусной кислоты до значения pH 6,5 и затем объединенный элюат разбавляли водой для инъекций (до достижения электропроводности менее 7 мСм/см). Полученный разбавленный элюат с доведенным значением pH загружали в колонку Capto DeVirS, которая уже была уравновешена раствором, содержащим 20 мМ HEPES и 50 мМ хлорида натрия при pH 6,5. Данную процедуру колоночной хроматографии с применением колонки Capto DeVirS проводили в режиме связывания и элюирования. Связанный с колонкой gp140 клады С затем элюировали элюирующим раствором, содержащим 25 мМ Tris и 185 мМ хлорида натрия при pH 7,5 (электропроводность приблизительно 19 мСм/см), с получением объединенного элюата.

10 **[0118]** На стадии 9 к объединенному элюату, собранному на вышеописанной стадии хроматографии с колонкой Capto DeVirS, добавляли 5 М хлорид натрия для доведения его электропроводности до 62 мСм/см, доводили значение pH 1 М уксусной кислотой до 3,5 для инактивации вирусов, подвергали нейтрализации с помощью 1 М Tris (pH 9,0) до достижения pH 4,5 и затем разбавляли водой для инъекций до достижения
15 электропроводности 30 мСм/см.

[0119] На стадии 10 разбавленный элюат, полученный на стадии 9, загружали в колонку Capto Adhere, которая уже была уравновешена раствором, содержащим 50 мМ ацетата натрия и 317 мМ хлорида натрия при pH 4,5. Данную процедуру колоночной хроматографии с применением колонки Capto Adhere проводили в проточном режиме
20 для удаления потенциально присутствующих нуклеиновых кислот и белков клеток-хозяев, и проточный раствор содержит белок gp140 клады С в 50 мМ ацетате натрия и 317 мМ хлориде натрия при pH 4,5.

[0120] На стадии 11 элюат (фактически представляющий собой проточный раствор), собранный на вышеописанной стадии хроматографии с применением колонки
25 Capto Adhere, подвергали нейтрализации с помощью 1 М Tris (pH 9,0) до pH 6,5 и затем пропускали через вирусный фильтр Planova 20N для фильтрации с задержкой вирусов. Полученный фильтрат подвергали конечной ультрафильтрации и диафильтрации (UFDF) в буфере для составления (стадия 12) и конечному составлению действующего вещества (стадия 13).

30 **[0121]** Способ очистки также включал тесты для межоперационного контроля (IPC), проведенные в ходе каждой стадии способа во время производственного процесса. Тесты для IPC были определены как тесты, процедуры проверки и измерения, осуществляемые в ходе изготовления для мониторинга и, при необходимости, корректировки способа, для обеспечения того, что полученный API или готовый

продукт будут соответствовать их спецификации. Остальные технологические тесты были определены как тесты для мониторинга процесса (PMT) и представляют собой тесты, процедуры проверки и измерения, выполняемые в ходе рутинного производства для мониторинга процесса, чтобы гарантировать, что процесс находится под контролем.

[0122] Пример 2. Очистка мозаичного gp140

[0123] Блок-схема способа изготовления действующего вещества мозаичного gp140, начиная с предварительного культивирования и размножения клеток и

10 заканчивая действующим веществом (DS), показана на фиг. 4. Крупномасштабное изготовление мозаичного gp140 предусматривает способы со стадией 1 (предварительное культивирование и применение биореактора для выращивания посевного материала), стадией 2 (продуцирование в объеме 2000 л в одноразовом биореакторе (SUB)), стадией 3 (флокулирование при pH 5) и стадией 4 (осветление). В

15 процессе предварительного культивирования используется линия клеток PER.C6, которая экспрессирует мозаичный gp140, и процесс предусматривает размножение клеток с применением встряхиваемых колб после оттаивания флакона, применение одноразового реактора от компании WAVE и биореактора объемом 500 л для выращивания посевного материала. Максимальная продолжительность стадии 1

20 составляет 40 дней для предварительного культивирования, включая применение биореактора для выращивания посевного материала. Затем партия переносится в SUB объемом 2000 л для процесса продуцирования (стадия 2) после инокуляции. Целевая продолжительность процесса продуцирования в SUB объемом 2000 л составляет 19

25 дней. Полученное содержимое SUB объемом 2000 л затем подвергается флокулированию посредством доведения значения pH 1 М уксусной кислотой до целевого значения pH 5,0 (стадия 3). За флокулированием следует осветление (стадия 4) посредством центрифугирования, глубинной фильтрации и окончательной фильтрации или посредством только глубинной фильтрации и окончательной фильтрации.

30 **[0124]** На стадии 5 значение pH полученного фильтрата довели до pH 5,25 с помощью 1 М Tris (pH 9) и 5 М хлорида натрия с электропроводностью 15 мСм/см и затем фильтрат загружали в колонку Capto MMC ImpRes, которая уже уравновешена 50 mM ацетатом натрия при pH 5,0. Данную процедуру колоночной хроматографии с применением колонки Capto MMC ImpRes проводили в режиме связывания и

элюирования для удаления белков клеток-хозяев и потенциально присутствующей ДНК. Связанный с колонкой мозаичный gp140 затем элюировали элюирующим раствором, содержащим 50 мМ HEPES и 400 мМ хлорида натрия при pH 7,0 с получением объединенного элюата.

5 **[0125]** На стадии 6 объединенный элюат, собранный на вышеописанной стадии хроматографии с колонкой Capto MMC ImpRes, подвергали нейтрализации с помощью 1 М Tris (pH 9,0) и затем разбавляли водой для инъекций с получением объединенного элюата с pH 8,0 и электропроводностью 5,5 мСм/см. Полученный разбавленный элюат с доведенным значением pH загружали в колонку POROS 50 HQ, которая уже была
10 уравновешена раствором, содержащим 50 мМ Tris с pH 8,0. Колоночную хроматографию с применением колонки POROS 50 HQ проводили в режиме связывания и элюирования для дополнительного удаления белков клеток-хозяев и потенциально присутствующей ДНК. Связанный с колонкой мозаичный gp140 затем элюировали посредством градиентного элюирования с помощью 6-42% буфера В с
15 длиной градиента, составляющей 11,0 CV, где буфер А представлял собой 50 мМ Tris при pH 8,0, и буфер В представлял собой смесь 50 мМ Tris и 500 мМ хлорида натрия при pH 8,0, и электропроводность повышали с приблизительно 6 до 20 мСм/см.

[0126] На стадии 7 к объединенному элюату, собранному на вышеописанной стадии хроматографии с колонкой POROS 50 HQ, добавляли 5 М хлорид натрия для доведения
20 электропроводности объединенного элюата до 56 мСм/см и значение pH довели 1 М уксусной кислотой до pH 3,5 для инактивации вирусов.

[0127] На стадии 8 элюат, полученный на стадии 7, загружали в колонку Capto Adhere, которая уже была уравновешена раствором, содержащим 50 мМ ацетата натрия и 650 мМ хлорида натрия при pH 3,5. Данную процедуру колоночной хроматографии с
25 колонкой Capto Adhere проводили в проточном режиме для удаления потенциально присутствующих нуклеиновых кислот и белков клеток-хозяев. Объединенный элюат подвергали нейтрализации с помощью 1 М Tris (pH 9,0) до pH 6,5.

[0128] На стадии 9 нейтрализованный элюат пропускали через вирусный фильтр Planova 20N для фильтрации с задержкой вирусов. Полученный фильтрат подвергали
30 конечной ультрафильтрации и диафильтрации (UFDF) в буфере для составления (стадия 10) и конечному составлению действующего вещества (стадия 11).

[0129] Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены только для иллюстративных целей, и что в вышеописанные варианты осуществления можно будет вносить изменения без

отступления от их общего изобретательского замысла. Таким образом, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными раскрытыми вариантами осуществления, но предусматривает охват модификаций в рамках 5 сущности и объема настоящего изобретения, определенных в прилагаемой формуле изобретения.

Таблица 1. Последовательности белков оболочки HIV-1

SEQ ID NO: 1 – белок gp140 клады C (679 аминокислот)

10 AENLWVGNMW VTVYYGVPVW TDAKTTLFCA SDTKAYDREV HNVWATHACV PTDPNPQEIV
 LENVTFENFM WKNDMVDQMH EDIISLWDQS LKPCVKLTPL CVTLHCTNAT FKNNVTNDMN
 KEIRNCSFNT TTEIRDKKQQ GYALFYRPDI VLLKENRNNS NNSEYILINC NASTITQACP
 KVNFDPIPIH YCAPAGYAIL KCNNKTFSGK GPCNNVSTVQ CTHGIKPVVS TQLLLNGSLA
 EKEIIRSEN LTDNVKTIIV HLNKSVEIVC TRPNNNTRKS MRIGPGQTFY ATGDIIGDIR
 15 QAYCNISGSK WNETLKRKVE KLQENYNK TIKFAPSSGG DLEITTHSFN CRGEFFYCNT
 TRLFNNNATE DETITLPCRI KQIINMWQGV GRAMYAPPIA GNITCKSNIT GLLLVRDGGE
 DNKTEEIFRP GGGNMKDNWR SELYKYKVIE LKPLGIAPTG AKERVVEREE RAVGIGAVFL
 GFLGAAGSTM GAASLTTLVQ ARQLLSSIVQ QQSNNLLRAIE AQQHMLQLTV WGIKQLQTRV
 LAIERYLKDQ QLLGIWGCSSG KLICTTNVPW NSSWSNKSQT DIWNNMTWME WDREISNYTD
 20 TIYRLEDSQ TQQEKNEKDL LALDSWKNLW SWFDISNWLW YIKSRIEGRG SGGYIPEAPR
 DGQAYVRKDG EWVLLSTFL

SEQ ID NO: 2 – мозаичный белок gp140 (695 аминокислот)

25 AGKLWVTVYY GVPVWKEATT TLFASDAKA YDTEVHNVWA THACVPTDPN PQEVVLENT
 ENFNMWKNNM VEQMHEDIIS LWDQSLKPCV KLTPLCVTLN CTDDVRNVTN NATNTNSSWG
 EPMEKGEIKN CSFNITTSIR NKVQKQYALF YKLDVVPIDN DSNNTNYRLI SCNTSVITQA
 CPKVSFEPIP IHYCAPAGFA ILKCNDDKFN GTGPCTNVST VQCTHGIRPV VSTQLLLNGS
 LAEEEVVIRS ENFTNNAKTI MVQLNVSVEI NCTRPNNNTR KSIHIGPGRA FYTAGDIIGD
 30 IRQAHCNISR ANWNNTLRQI VEKLGKQFGN NKTIVFNHSS GGDPEIVMHS FNCGGEFFYC
 NSTKLFNSTW TWNNSTWNNT KRSNDTEEHI TLPCRIKQII NMWQEVGKAM YAPPIRGQIR
 CSSNITGLLL TRDGGNDTSG TEIFRPGGGD MRDNWRSELY KYKVVKIEPL GVAPTAKER
 VVQREERAVG IGAVFLGFLG AAGSTMGAAS MTLTVQARLL LSGIVQQNN LLRAIEAQQH
 LLQLTVWGIK QLQARVLAVE RYLKDQQLLG IWGCSSGLIC TTTVPWNASW SNKSLDKIWN
 35 NMTWMEWERE INNYTSLIYT LIEESQNQQE KNEQELLELD KWASLWNWFD ISNWLWYIKS
 RIEGRGSGGY IPEAPRDGQA YVRKDGWVLL LSTFL

SEQ ID NO: 3 – (иллюстративная лидерная последовательность) – 29 аминокислот

MRVIRGIQRNC QHLWRWGTLI LGMLMICA

ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки белка оболочки (Env) вируса иммунодефицита человека (HIV), включающий:
 - 5 а. получение клеточного образца, такого как клеточный супернатант, содержащий белок Env HIV;
 - б. доведение значения pH клеточного образца до приблизительно 5,0 для осаждения таким образом белков клетки-хозяина (HCP) в клеточном образце;
 - 10 в. удаление осажденных HCP из клеточного образца посредством глубоинной фильтрации с получением фильтрата, содержащего белок Env HIV, и
 - д. очистку белка Env HIV в фильтрате посредством хроматографии.
- 15 2. Способ по п. 1, где образец инкубируют при pH приблизительно 5 предпочтительно в течение приблизительно 1-3 часов, предпочтительно приблизительно 3 часов, для осаждения HCP.
3. Способ по п. 1 или п. 2, где хроматография включает
 - 20 а. подвергание фильтрата, содержащего белок, ультрафильтрации (UF) и диафильтрации (DF) с получением ретентата, содержащего белок Env HIV, и
 - б. загрузку ретентата в первую колонку для очистки белка Env HIV.
- 25 4. Способ по п. 3, где белок Env HIV представляет собой белок gp140 HIV-1, и первая колонка содержит полимодальную смолу, обладающую свойствами гидрофобного взаимодействия и катионного обмена.
5. Способ очистки белка gp140 HIV-1, включающий захват белка на полимодальной смоле, обладающей свойствами гидрофобного взаимодействия и катионного обмена, и элюирование очищенной фракции с полимодальной
 - 30 смолы, где чистота белка gp140 HIV-1 значительно повышается по сравнению с белком в смеси при ее загрузке на полимодальную смолу.
6. Способ очистки белка gp140 HIV-1, включающий стадии:

i) получения композиции, содержащей белок gp140 HIV-1 и другие белки, являющиеся нежелательными, такие как белки клетки-хозяина, полученные из клетки-хозяина, в которой экспрессируется белок gp140 HIV-1;

ii) захвата белка gp140 HIV-1 на полимодальной смоле, обладающей свойствами гидрофобного взаимодействия и катионного обмена, и элюирования очищенной фракции, содержащей белок gp140 HIV-1, с полимодальной смолы;

iii) загрузки очищенной фракции, полученной на стадии ii), на анионообменную смолу для связывания белка gp140 HIV-1, и элюирования дополнительно очищенной фракции, содержащей белок gp140 HIV-1, с анионообменной смолы, и

iv) подвергания дополнительно очищенной фракции, полученной на стадии iii), воздействию полимодальной смолы, которая содержит анионообменные и гидрофобные функциональные группы, и элюирования дополнительно очищенного белка gp140 HIV-1.

7. Способ по п. 6, где белок gp140 HIV-1 представляет собой белок gp140 клады С, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 1.

8. Способ по п. 6 или п. 7, где белок gp140 HIV-1 связывается с полимодальной смолой на стадии ii) и позднее его элюируют.

9. Способ по любому из пп. 6-8, где полимодальную смолу на стадии iv) используют в проточном режиме.

10. Способ по любому из пп. 6-9, дополнительно включающий стадию загрузки дополнительно очищенной фракции белка gp140 HIV-1, полученной на стадии iii), на смолу с аффинной средой и элюирования дополнительно очищенной фракции, содержащей белок gp140 HIV-1, с указанной смолы, предпочтительно перед подверганием данной фракции стадии iv).

11. Способ по п. 10, где белок gp140 HIV-1 представляет собой мозаичный белок gp140, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 2.

12. Способ по п. 10 или п. 11, где смола с аффинной средой содержит лиганд, представляющий собой сульфат или декстрансульфат.

13. Способ по любому из пп. 10-12, где белок gp140 HIV-1 связывается со смолой с аффинной средой и позднее его элюируют.
- 5 14. Способ по любому из пп. 6-13, где композицию на стадии i) получают с помощью клеток-хозяев в биореакторе.
15. Способ по п. 14, где объем биореактора составляет от приблизительно 1 л до приблизительно 20000 л, предпочтительно от приблизительно 10 л до
- 10 приблизительно 16500 л.
16. Способ по любому из пп. 6-15, где способ дополнительно включает доведение значения рН композиции до приблизительно 5,0 с осаждением таким образом белков клетки-хозяина (HCP) в композиции перед стадией i).
- 15 17. Способ по любому из пп. 6-16, где очищенный белок gp140 HIV-1 подвергают стадии фильтрации с задержкой вирусов.
18. Способ по любому из пп. 6-17, где очищенный белок gp140 HIV-1 подвергают ультрафильтрации (UF) и диафильтрации (DF).
- 20 19. Способ по любому из пп. 6-18, где очищенный белок gp140 HIV-1 подвергают стадии конечного составления.
- 25 20. Вакцина, содержащая белок, выделенный посредством способа по любому из пп. 1-19, и фармацевтически приемлемый носитель.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки белка gp140 HIV-1, включающий стадии:
 - i) получения композиции, содержащей белок gp140 HIV-1 и другие белки, являющиеся
5 нежелательными, такие как белки клетки-хозяина, полученные из клетки-хозяина, в которой экспрессируется белок gp140 HIV-1;
 - ii) захвата белка gp140 HIV-1 на полимодальной смоле, обладающей свойствами гидрофобного взаимодействия и катионного обмена, и элюирования очищенной фракции, содержащей белок gp140 HIV-1, с полимодальной смолы;
 - 10 iii) загрузки очищенной фракции, полученной на стадии ii), на анионообменную смолу для связывания белка gp140 HIV-1, и элюирования дополнительно очищенной фракции, содержащей белок gp140 HIV-1, с анионообменной смолы, и
 - iv) подвергания дополнительно очищенной фракции, полученной на стадии iii), воздействию полимодальной смолы, которая содержит анионообменные и
15 гидрофобные функциональные группы, и элюирования дополнительно очищенного белка gp140 HIV-1.

2. Способ по п. 1, где белок gp140 HIV-1 представляет собой белок gp140 клады C, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 1.
20

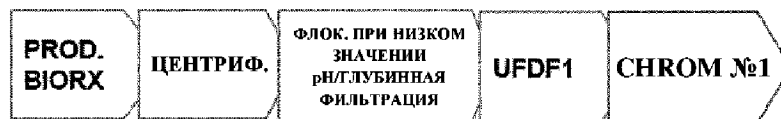
3. Способ по п. 1 или п. 2, где белок gp140 HIV-1 связывается с полимодальной смолой на стадии ii) и позднее его элюируют.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где полимодальную смолу на стадии iv)
25 используют в проточном режиме.

5. Способ по любому из пп. 1-4, дополнительно включающий стадию загрузки дополнительно очищенной фракции белка gp140 HIV-1, полученной на стадии iii), на смолу с аффинной средой и элюирования дополнительно очищенной фракции,
30 содержащей белок gp140 HIV-1, с указанной смолы, предпочтительно перед подверганием данной фракции стадии iv).

6. Способ по п. 5, где белок gp140 HIV-1 представляет собой мозаичный белок gp140, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 2.

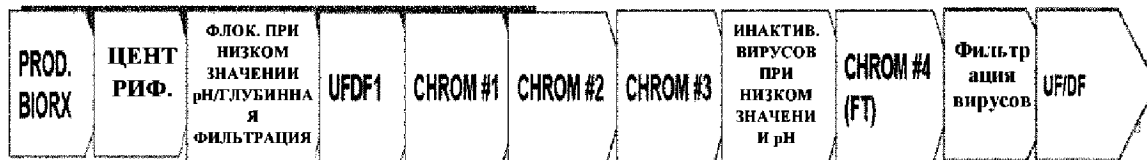
7. Способ по п. 5 или п. 6, где смола с аффинной средой содержит лиганд, представляющий собой сульфат или декстрансульфат.
- 5 8. Способ по любому из пп. 5-7, где белок gp140 HIV-1 связывается со смолой с аффинной средой и позднее его элюируют.
9. Способ по любому из пп. 1-8, где композицию на стадии i) получают с помощью клеток-хозяев в биореакторе.
- 10 10. Способ по п. 9, где объем биореактора составляет от приблизительно 1 л до приблизительно 20000 л, предпочтительно от приблизительно 10 л до приблизительно 16500 л.
- 15 11. Способ по любому из пп. 1-10, где способ дополнительно включает доведение значения рН композиции до приблизительно 5,0 с осаждением таким образом белков клетки-хозяина (HCP) в композиции перед стадией i).
- 20 12. Способ по любому из пп. 1-11, где очищенный белок gp140 HIV-1 подвергают стадии фильтрации с задержкой вирусов.
13. Способ по любому из пп. 1-12, где очищенный белок gp140 HIV-1 подвергают ультрафильтрации (UF) и диафильтрации (DF).
- 25 14. Способ по любому из пп. 1-14, где очищенный белок gp140 HIV-1 подвергают стадии конечного составления.



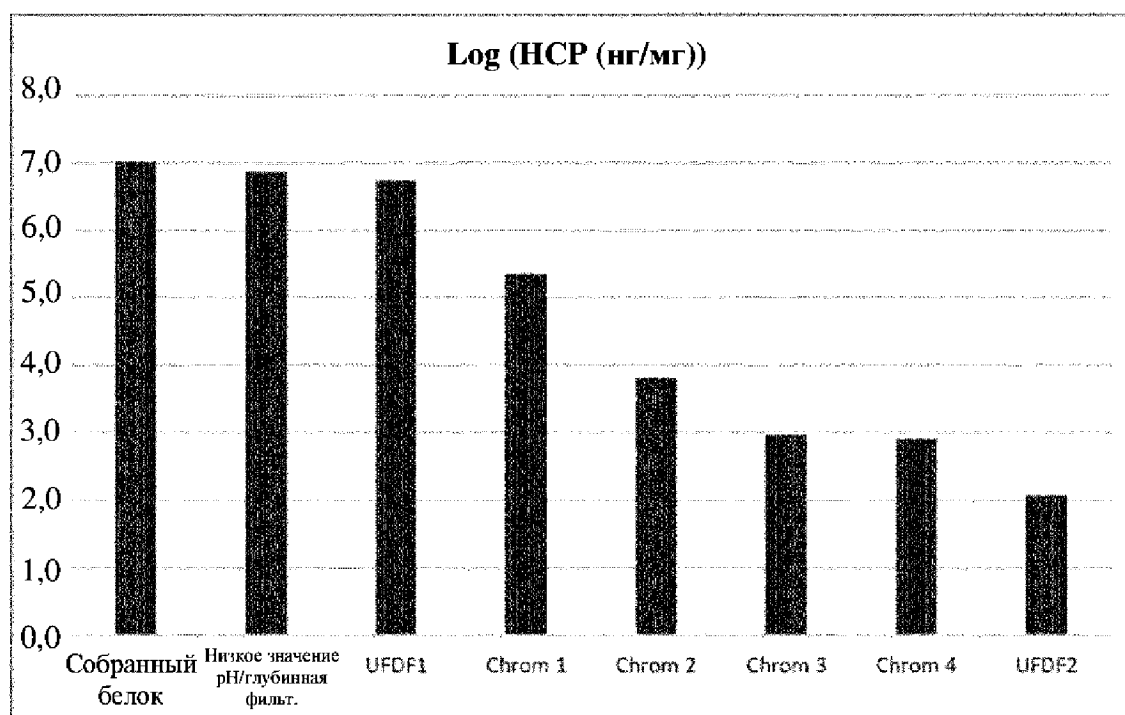
Фиг. 1А



Фиг. 1В



Фиг. 2А



Фиг. 2В

Стадия 1 Размножение клеток (предварительное культивирование)	Стадия 8 Хроматография с колонкой Capto™ DeVirS
Стадия 2 Продуцирование белка посредством периодического культивирования с подпиткой в биореакторе	Стадия 9 Инактивация вирусов при низком значении pH
Стадия 3 и 4 Флокулирование при низком значении pH и осветление	Стадия 10 Хроматография с колонкой Capto™ Adhere
Стадия 5 Начальная UFDF	Стадия 11 Фильтрация с задержкой вирусов
Стадия 6 Хроматография с колонкой Capto™ MMC ImpRes	Стадия 12 Ультрафильтрация/диафильтрация
Стадия 7 Хроматография с колонкой POROS™ HQ	Стадия 13 Конечное составление

Фиг. 3

Стадия 1 Размножение клеток (предварительное культивирование)	Стадия 7 Инактивация вирусов при низком значении pH
Стадия 2 Продуцирование белка посредством периодического культивирования с подпиткой в биореакторе	Стадия 8 Хроматография с колонкой Capto™ Adhere
Стадия 3 Флокулирование при низком значении pH	Стадия 9 Фильтрация с задержкой вирусов
Стадия 4 Осветление	Стадия 10 Ультрафильтрация/диафильтрация
Стадия 5 Хроматография с колонкой Capto™ MMC ImpRes	Стадия 11 Конечное составление (DS @ 0,59 мг/мл)
Стадия 6 Хроматография с колонкой POROS™ HQ	

Фиг. 4