

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046696**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.11
- (21) Номер заявки
201992107
- (22) Дата подачи заявки
2013.10.18
- (51) Int. Cl. *A61K 39/42* (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

(54) **БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИ-ВИЧ-АНТИТЕЛО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

- (31) **61/715,642**
- (32) **2012.10.18**
- (33) **US**
- (43) **2020.04.30**
- (62) **201590741; 2013.10.18**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РОКФЕЛЛЕР ЮНИВЕРСИТИ (ДЗЕ);
КЭЛИФОРНИЯ ИНСТИТЬЮТ ОФ
ТЕКНОЛОДЖИ (US)**
- (72) Изобретатель:
**Мукэ Хьюго, Нуссенцвейг Мишель,
Бьеркман Памела Дж., Шарф Луиз
(US)**
- (74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)
- (56) **WO-A2-2012030904
US-A1-20110262474**

-
- (57) Настоящее изобретение относится к биспецифическим анти-ВИЧ-антителам. Также раскрыты клетка, для экспрессии указанного биспецифического антитела, фармацевтическая композиция, содержащая указанное биспецифическое антитело и фармацевтически приемлемый носитель, а также способ профилактики или лечения ВИЧ-инфекции или заболевания, связанного с ВИЧ, используя указанное биспецифическое антитело.

B1

046696

**046696
B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет согласно 35 U.S.C. § 119(e) на основании предварительной заявки на выдачу патента США № 61/715642, поданной 18 октября 2012, которая включена в настоящее описание в полном объеме.

Интересы правительства

Изобретение, раскрытое в настоящем описании, осуществлено, по меньшей мере, частично, при поддержке правительства в рамках гранта № P01 A1081677, присужденного Национальными институтами здравоохранения. Соответственно правительство США обладает некоторыми правами на настоящее изобретение.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к эффективным антителам широкого спектра действия против вируса иммунодефицита человека ("ВИЧ").

Уровень техники

ВИЧ вызывает синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), состояние у людей, характеризуемое рядом клинических признаков, включая синдромы истощения, дегенерацию центральной нервной системы и глубокую иммуносупрессию, которая приводит к угрожающим жизни оппортунистическим инфекциям и злокачественным новообразованиям. Со времени его открытия в 1981 году ВИЧ типа 1 (ВИЧ-1) привел к гибели по меньшей мере 25 миллионов людей во всем мире. Прогнозируют, что 20-60 миллионов людей будут инфицированы в течение следующих двух десятилетий, несмотря на то, что имеет место ежегодное снижение ВИЧ-инфекций на 2,5%. Существует необходимость в терапевтических средствах и способах лечения или подавления ВИЧ-инфекции.

У некоторых ВИЧ-инфицированных людей в сыворотке обнаруживаются нейтрализующие IgG-антитела широкого спектра действия. Тем не менее, мало известно о специфичности и активности таких антител, несмотря на их возможное важное значение для разработки эффективных вакцин. В животных моделях пассивный перенос нейтрализующих антител может вносить вклад в защиту от заражения вирусом. Ответы в виде нейтрализующих антител также могут развиваться у ВИЧ-инфицированных людей, но детальный состав серологического ответа еще полностью не раскрыт.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к новым категориям нейтрализующих анти-ВИЧ-антител широкого спектра действия. Консенсусные аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей антител перечислены ниже и показаны на фигурах 3a и 3b:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCSVSGX1SX2X3DX4YWSWIRQSPGKGLEWIGYVHDS

GDTNYNPSLKS RVX5X6SLDTSKNQVSLK LX7X8VTAADSAX9YYCARAX10HGX11RIYGIV

AFGEX12FTYFYMDVWGKTTVTVSS (SEQ ID NO:1)

SX1VRPQPPLSVAPGETARIX2CGEX3SLGSRVQWYQQRPGQAPSLIYYNQDRPS

GIPERFSGSPDX4X5FGTTATLTI TX6VEAGDEADY YCHIWDSRX7PTX8WVFGGGTTLTVL

(SEQ ID NO:2)

В последовательности SEQ ID NO: 1 или 2 каждый "X" может быть любым аминокислотным остатком или означать отсутствие аминокислоты. Предпочтительно, каждый из X может представлять собой остаток в соответствующем положении клональных вариантов 10-259, 10-303, 10-410, 10-847, 10-996, 10-1074, 10-1121, 10-1130, 10-1146, 10-1341 и 10-1369, которые показаны на фигурах 3a и 3b, и искусственно модифицированного варианта антитела 10-1074, 10-1074GM.

Соответственно, один аспект настоящего изобретения характеризует выделенное анти-ВИЧ-антитело, или его антигенсвязывающую часть, имеющую по меньшей мере одну определяющую комплементарную область (CDR), имеющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO:33-38, при условии, что антитело не является антителом PGT-121, 122 или 123. Последовательности SEQ ID NO:33-38 относятся к последовательностям CDR тяжелой цепи (CDRH) 1-3 и CDR легкой цепи (CDRL) 1-3 согласно системе Кабата, как показано на фиг. 3a и 3b. В одном из вариантов осуществления CDR может содержать последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO:39-104, т.е., последовательностей CDR согласно системе Кабата, которые показаны в табл. 1 ниже. Альтернативно CDR может содержать последовательность, выбранную из последовательностей CDR соответствующих антител согласно системе IMGT, которые показаны в табл. 1 ниже.

В одном из вариантов осуществления выделенное анти-ВИЧ-антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая включает CDRH 1, CDRH 2 и CDRH 3, при этом CDRH 1, CDRH 2 и CDRH 3 содержат соответствующие последовательности SEQ ID NO:33-35. CDRH 1, CDRH 2 и CDRH 3 также могут содержать соответствующие последовательности набора CDRH, выбранные из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO:39-41, SEQ ID NO:45-47, SEQ ID NO: 51-53, SEQ ID NO: 57-59, SEQ ID NO: 63-65, SEQ ID NO: 69-71, SEQ ID NO:75-77, SEQ ID NO:81-83, SEQ ID NO:87-89, SEQ ID NO: 93-95, SEQ ID NO: 99-101 и SEQ ID NO: 131-133. Альтернатив-

но CDRH могут содержать соответствующие последовательности, выбранные из последовательностей, соответствующих последовательностям CDR антител согласно системе IMGT, которые показаны в табл. 1 ниже.

В другом варианте осуществления выделенное анти-ВИЧ-антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельную область легкой цепи, которая включает CDRL 1, CDRL 2 и CDRL 3, при этом CDRL 1, CDRL 2 и CDRL 3 содержат соответствующие последовательности SEQ ID NO:36-38. Например, CDRL 1, CDRL 2 и CDRL 3 могут содержать соответствующие последовательности из набора CDRL, выбранные из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO:42-44, SEQ ID NO:48-50, SEQ ID NO: 54-56, SEQ ID NO: 60-62, SEQ ID NO: 66-68, SEQ ID NO:72-74, SEQ ID NO:78-80, SEQ ID NO:84-86, SEQ ID NO: 90-92, SEQ ID NO: 96-98, SEQ ID NO: 102-104 и SEQ ID NO: 134-136. Альтернативно CDRL могут содержать соответствующие последовательности, выбранные из соответствующих последовательностей CDR антител согласно системе IMGT, которые показаны в табл. 1 ниже.

В следующем варианте осуществления указанное выше выделенное анти-ВИЧ-антитело или его антигенсвязывающая часть содержит (i) вариабельную область тяжелой цепи, которая включает CDRH 1, CDRH 2 и CDRH 3, и (ii) вариабельную область легкой цепи, которая включает CDRL 1, CDRL 2 и CDRL 3. CDRH 1, CDRH 2, CDRH 3, CDRL 1, CDRL 2 и CDRL 3 могут содержать соответствующие последовательности из набора CDR, выбранные из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO:39-44, SEQ ID NO:45-50, SEQ ID NO: 51-56, SEQ ID NO: 57-62, SEQ ID NO: 63-68, SEQ ID NO: 69-74, SEQ ID NO:75-79, SEQ ID NO:81-86, SEQ ID NO:87-92, SEQ ID NO: 93-98, SEQ ID NO: 99-104 и SEQ ID NO: 131-136. Альтернативно CDRH и CDRL могут содержать соответствующие последовательности, выбранные из последовательностей, соответствующих последовательностям CDR антител согласно системе IMGT, которые показаны в табл. 1 ниже.

В следующем варианте осуществления выделенное анти-ВИЧ-антитело или его антигенсвязывающая часть содержит одну или обе цепи: (i) тяжелую цепь, имеющую консенсусную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и (ii) легкую цепь, имеющую консенсусную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Тяжелая цепь может содержать последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, и 129, и легкая цепь может содержать последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 и 130. Например, тяжелая цепь и легкая цепь может содержать соответствующие последовательности SEQ ID NO:3-4, SEQ ID NO: 5-6, SEQ ID NO:7-8, SEQ ID NO: 9-10, SEQ ID NO: 11-12, SEQ ID NO: 13-14, SEQ ID NO: 15-16, SEQ ID NO: 17-18, SEQ ID NO: 19-20, SEQ ID NO: 21-22, SEQ ID NO: 23-24 и 129-130.

В предпочтительном варианте осуществления выделенное анти-ВИЧ-антитело представляет собой антитело, выбранное из группы, состоящей из антител 10-259, 10-303, 10-410, 10-847, 10-996, 10-1074, 10-1074GM, 10-1121, 10-1130, 10-1146, 10-1341 и 10-1369. Их соответствующие вариабельные области тяжелой цепи, вариабельные области легкой цепи, CDRH 1-3 и CDRL 1-3 показаны на фиг. 3а и 3b. В более предпочтительном варианте осуществления выделенное анти-ВИЧ-антитело является 10-1074-подобным антителом, т.е., антителом, выбранным из группы, состоящей из 10-847, 10-996, 10-1074, 10-1074GM, 10-1146 и 10-1341. Антитело из такой группы является более эффективным в нейтрализации современных вирусов, чем PGT121. Обсуждаемое выше антитело может быть антителом человека, гуманизированным антителом или химерным антителом.

Во втором аспекте изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность, кодирующую CDR, вариабельную область тяжелой цепи или вариабельную область легкой цепи обсуждаемого выше анти-ВИЧ-антитела или его антигенсвязывающей части. Также отличительным признаком изобретения является вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, и культивируемая клетка, содержащая вектор.

Нуклеиновую кислоту, вектор и культивируемую клетку можно использовать в способе получения анти-ВИЧ-антитела или его фрагмента. Способ включает, наряду с прочими, стадии: получения указанной выше культивируемой клетки; культивирования клетки в среде в условиях, обеспечивающих возможность экспрессии полипептида, кодируемого вектором, и сборки антитела или его фрагмента, и очистки антитела или фрагмента из культивируемой клетки или среды для клетки.

В третьем аспекте отличительным признаком изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая (i) по меньшей мере одно анти-ВИЧ-антитело, указанное выше, или его антигенсвязывающую часть и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

В четвертом аспекте изобретение относится к способу профилактики или лечения ВИЧ-инфекции или связанного с ВИЧ заболевания. Способ включает, наряду с прочими, стадии: идентификации пациента, нуждающегося в такой профилактике или лечении, и введения указанному пациенту первого терапевтического средства, содержащего терапевтически эффективное количество, по меньшей мере, одного анти-ВИЧ-антитела, указанного выше, или его антигенсвязывающей части. Способ может дополнительно включать введение второго терапевтического средства, такого как противовирусное средство.

В пятом аспекте изобретение относится к набору, содержащему фармацевтически приемлемую стандартную дозированную форму, содержащую фармацевтически эффективное количество по меньшей

мере одного выделенного анти-ВИЧ-антитела, указанного выше, или его антигенсвязывающей части, и фармацевтически приемлемую стандартную дозированную форму, содержащую фармацевтически эффективное количество анти-ВИЧ-средства. Две фармацевтически приемлемые стандартные дозированные формы необязательно могут быть в форме одной фармацевтически приемлемой стандартной дозированной формы. Примером анти-ВИЧ-средства может быть средство, выбранное из группы, состоящей из нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы, ингибитора протеазы, ингибитора проникновения или слияния и ингибитора интегразы.

В шестом аспекте изобретение относится к набору для диагностики, прогнозирования или контроля лечения ВИЧ-инфекции у индивида. Набор содержит один или несколько реагентов для выявления, которые специфично связываются с нейтрализующими анти-ВИЧ-антителами в биологическом образце, полученном от индивида. Набор может дополнительно содержать реагенты для осуществления ПЦР или масс-спектрометрии.

Подробное описание одного или нескольких вариантов осуществления изобретения приведено ниже. Другие признаки, цели и преимущества изобретения будут понятны из описания и формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана нейтрализующая активность PGT121-подобных и 10-1074-подобных вариантов. (A) Двумерная цветовая карта, сравнивающая эффективности нейтрализации PGT121-подобных и 10-1074-подобных антител в анализе TZM-b1. Более темная окраска = более эффективная нейтрализация; белая = нет нейтрализации. (B) Корреляция между средним значением IC80 против 9 вирусов (ось y) и кажущимися значениями KD для связывания с gp120 и gp140 (ось x). (C) График, на котором приведено сравнение широты и эффективности нейтрализации антител PGT121, 10-996 и 10-1074 в анализе на TZM-b1 против расширенной панели из 119 вирусов. На оси y показана кумулятивная частота значений IC50 вплоть до концентрации, показанной на оси x. "Паутиный" график (в верхнем левом углу) показывает распределение частоты нейтрализованных вирусов в соответствии с кладами ВИЧ-1. (D) Точечная диаграмма, показывающая молярные соотношения нейтрализации (MNR; отношение концентраций IC50 Fab и IgG). Горизонтальные столбики представляют средние IC50 для всех вирусов. (E) Столбчатая диаграмма, сравнивающая эффективности нейтрализации PGT121 (темно-серый) и 10-1074 (светло-серый) против вирусов, выделенных из исторических (исторические) и современных (современные) сероконверторов. ns - не значимы; **, $p < 0,005$. Указано кратное различие между медианными значениями IC50 для нейтрализации современных вирусов под действием PGT121 и 10-1074.

На фиг. 2 показаны: активности мутантных антител PGT12GM и 10-1074GM в связывании и нейтрализации. (A) Столбчатые диаграммы, сравнивающие кажущиеся значения KD для связывания антител 10-1074, PGT121, PGT121GM и 10-1074GM с gp120 и gp140. Планки погрешностей показывают SEM KD-значений, полученных из трех независимых экспериментов. Показаны кратные различия между KD-значениями антител "дикого типа" и "гликомутантов". (B) Столбчатые диаграммы, сравнивающие связывание гликанов (фигура 7A) антителами PGT121 и 10-1074 и связывание гликанов мутантными антителами (PGT121GM и 10-1074GM). Числовую оценку связывания давали в виде интенсивности флуоресценции (средние для пятен в двух повторях) для зондов распределенных по 5 фмоль на пятно. (C) График охвата, сравнивающий широту и эффективность нейтрализации антител PGT121, PGT121GM, 10-1074 и 10-1074GM в анализе на TZM-b1 против панели из 40 вирусов.

На фиг. 3 изображены: выравнивания последовательностей клональных вариантов PGT121 и 10-1074. (A) Выравнивание аминокислот тяжелых цепей (IgH) PGT121-подобных и 10-1074-подобных антител и вероятной VH зародышевой линии (GL) для всех клональных вариантов. Указана нумерация аминокислот, основанная на кристаллических структурах, каркасные (FWR) и определяющие комплементарность области (CDR) согласно системе Кабата (J. Exp. Med. 132(2): 211-250) и IMGT (Nucleic Acids Res. 37 (Database issue) : D1006-1012). Цветовая штриховка показывает кислые (красные), основные (синие) аминокислоты и тирозин (зеленый). (B) То же, что и в A, но для легких цепей (IgL).

Фиг. 4 показывает: Аффинность связывания клональных вариантов PGT121 и 10-1074. (A) Аффинность связывания в случае взаимодействия вариантов IgG-антитела PGT121 с лигандами gp140 и gp120 YU-2, которую измеряли, используя резонанс поверхностного плазмона (SPR). M, моль/л; сек, секунды; RU, единиц ответа; /, связывание не выявлено. Значение $\chi^2 < 10$ указывает, что модель связывания 1:1, используемая для подгонки кривых, адекватно описывала экспериментальные данные. Равновесные и кинетические константы считали "кажущимися" константам, учитывая эффекты авидности в результате бивалентного связывания IgG. (B) Точечные графики, показывающие константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) для PGT 121-подобных (синее закрашивание) и 10-1074-подобных (зеленое окрашивание) антител. (C) Графики линейной регрессии, сравнивающие значения k_a и k_d IgG-антител для их связывания с gp120 и gp140 (ось x) против их эффективностей нейтрализации (средние значения IC80) 9 вирусов, показанных в табл. 4 (ось y).

На фиг. 5 изображено: связывание вариантов PGT121 с "коровыми" белками gp120, мутантом gp120GD324-5AA и линейными пептидами gp120v3. (A) Основанные на ELISA анализы связывания PGT121-подобных и 10-1074-подобных антител с gp120core HXB2 и коровыми белками 2CC по сравнению с интактным gp120 YU-2. На оси x показана концентрация антител (M), необходимая для получения

значений ELISA (OD405 нм), показанных на оси у. Анти-CD4bs-антитело VRC01 (Science 329(5993): 856-861), антитело против петли V3 10-188 (PLoS One 6(9): e24078) и нереактивное по отношению к ВИЧ антитело mGO53 (Science 301(5638): 1374-1377) использовали в качестве контролей. (B) То же, что и в случае (A), но для связывания с мутантным белком gp120GD324-5AA, (C) Столбчатая диаграмма, сравнивающая реактивности в ELISA PGT121- и 10-1074-подобных антител и контрольных антител (позитивный контроль, 10-188, 1-79, 2-59 и 2-1261 (Nature 458(7238): 636-640)), и негативный контроль, mGO53) против перекрывающихся пептидов gp120v3-C3. На оси у показаны значения ELISA (OD405 нм), полученные при тестировании IgG-антител в концентрации 2 мкг/мл. Аминокислотные последовательности отдельных пептидов показаны внизу справа. Все эксперименты осуществляли по меньшей мере в двух повторях. Показаны типичные данные.

На фиг. 6 изображено: связывание PGT121 с мутантами по гликозилированию gp120 и дегликозилированным gp120. (A) Основанные на ELISA анализы связывания вариантов антител PGT121 и 10-1074 с gp120, gp120NNT301-303AAA, gp120N332A и gp120N332A/NNT301-303AAA. На оси x показана концентрация антител (M), необходимая для получения значений ELISA (OD405 нм), указанных на оси у. Черные пунктирные и сплошные линии показывают усредненную реактивность против четырех антигенов позитивных (10-188) и негативных (mGO53) контрольных антител. (B) Окрашенный серебром SDS-ПААГ-гель, на котором сравнивали необработанный gp120 (WT, дикого типа), расщепленный PNG-азой F и EndoH gp120s. L, лэддер белков. (C) То же, что и в случае (A), но сравнение между необработанным и обработанным PNG-азой F gp120. (D) То же, что и в случае (A), но сравнение между необработанным и обработанным EndoH gp120. Все эксперименты осуществляли по меньшей мере в двух повторях.

На фиг. 7 изображено: связывание клональных вариантов PGT121 и 10-1074 с гликанами. (A) Последовательности моносахаридов набора N-гликановых зондов, используемых в анализе на микроматрицах гликанов, чтобы исследовать PGT121-подобные и 10-1074-подобные антитела в отношении прямого связывания с N-гликанами. ДН означает липидную метку 1,2-дигексадецил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DHPE), с которым N-гликаны были конъюгированы посредством восстановительного аминирования. Ключевыми признаками, которые следует отметить, являются (i) антитела PGT121-группы связывали одноантенный N-гликановый зонд 10 (N2), при этом заканчивающаяся галактозой антенна связывалась 1-3-связью с маннозой кора, но не связывали изомерный N-гликановый зонд 11 (обозначенный N4) с антенной, связанной 1-6-связью с маннозой кора; (ii) присутствие такой заканчивающейся галактозой 1-6-связанной антенны, как в двухантенном зонде 13 (NA2), позволяло связывание, как при присутствии α-2-6-связанной (но не α-2-3-связанной) сиаловой кислоты; (iii) двухантенный зонд 12 (NGA2), не имеющий галактозы и заканчивающийся N-ацетилглюкозамином, не связывался. (B) Столбчатые диаграммы, сравнивающие связывание гликанов PGT121-подобными, 10-1074-подобными и антителами и антителами варианта зародышевой линии (GL). 10-188, антитело против петли V3, использовали в качестве негативного контроля. Числовую оценку связывания получали в виде интенсивности флуоресценции (средние для пятен в двух повторях) для зондов, распределенных по 2 фмоль (белые) и 5 фмоль на пятно (серые).

На фиг. 8 изображено: активность антител в связывании и нейтрализации против gp120 только с высоким содержанием маннозы и вирусов. (A) На окрашенном серебром SDS-ПААГ-геле сравнивают gp120 YU-2, продуцированный в клетках, обработанных кифунензином (gp120kif) и gp120, продуцированным в необработанных клетках (WT, дикого типа). L, белковый лэддер. (B) Сравнение в ELISA связывания PGT 121-подобных (синие метки) и 10-1074-подобных (зеленые метки) антител к gp120 YU-2 (gp120 WT) и gp120kif. На оси x показана концентрация антител (M), необходимая для получения в ELISA значений (OD405 нм), показанных на оси у. (C) Кривые нейтрализации для PGT121, оцениваемые против выбранных PGT121-чувствительных/10-1074-резистентных псевдовирюсов, полученных в присутствии (вирус kif) или в отсутствие (вирус WT) кифунензина. Пунктирная горизонтальная линия показывает 50% нейтрализацию, на основании которой может быть получено значение IC50, исходя из концентрации антитела на оси x. Эксперименты осуществляли в трех повторях. Планки погрешностей показывают SD для измерений в трех повторях. (D) Столбчатые графики, сравнивающие активность в нейтрализации выбранных антител против псевдовирюсов YU-2 и PVO.4, полученных в клетках HEK 2 93S GnTI-/- (67Вирус GnTI-/-) или в клетках дикого типа (вирус WT). На оси у показаны средние значения IC50 (мкг/мл) для нейтрализации вирусов, показанных на оси x. Планки погрешностей показывают SEM значений IC50, полученных в двух независимых экспериментах.

На фиг. 9 показана: активность в нейтрализации PGT121, 10-996 и 10-1074. (A) График, сравнивающий эффективности нейтрализации PGT121, 10-996 и 10-74 против вирусов указанных клад ВИЧ-1 (определенные с использованием анализа TZM-bl и панели из 119 псевдовирюсов). На оси x показана концентрация антител (мкг/мл), необходимая для достижения 50% нейтрализации (IC50). На оси у показана кумулятивная частота значений IC50 вплоть до концентрации, показанной на оси x. (B) График, сравнивающий широту и эффективность нейтрализации для антител PGT121, 10-996 и 10-1074 против расширенной панели из 119 вирусов, которые определяли в анализе нейтрализации TZM-bl. На оси у показана кумулятивная частота значений IC80 вплоть до концентрации, показанной на оси x. (C) На графиках показаны кривые нейтрализации выбранных вирусов под действием PGT121 и 10-1074. Пунктирная

горизонтальная линия показывает 50% нейтрализацию, на основании которой может быть получено значение IC50, исходя из концентрации антител, указанной на оси x. Эксперименты осуществляли в трех повторах. Планки погрешностей показывают SD для измерений в трех повторах.

На фиг. 10 изображена: активность нейтрализации против исторических вирусов по сравнению с современными вирусами кланды В. Точечные графики сравнивают эффективности нейтрализации против вирусов кланды В, выделенных из исторических (исторические) и современных (современные) сероконверторов в случае выбранных bN-Ат. Горизонтальные столбики представляют медианные IC50 для всех вирусов у пациента. Различия между группами оценивали, используя критерий Манна-Уитни, ns - не значимы.

На фиг. 11 изображено: нейтрализация двух тропических SHIV R5 с использованием панели из 11 анти-ВИЧ-1-мАт широкого спектра действия. Вычисленные значения IC50 для нейтрализации SHIVAD8EO (А) и SHIVDH12-V3AD8 (В).

На фиг. 12 изображено: Взаимосвязь концентраций в плазме пассивно вводимых нейтрализующих мАт с вирусным заражением после провокационного заражения макак двумя разными SHIV R5. Заштрихованные кружки показывают защищенных (без заражения) обезьян, незаштрихованные кружки означают инфицированных животных.

На фиг. 13 изображено: концентрация в плазме bN-Ат. Концентрацию мАт определяли путем измерения нейтрализующей активности в образцах плазмы. (А) Значения ID50, измеренные в анализе нейтрализации TZM.bl 10-1074 и 3BNC117 против штаммов ВИЧ-1, которые чувствительны к одному, но не чувствительны к другому bN-Ат (т.е., штамм ВИЧ-1 X2088_9 (чувствительный к 10-1074); штамм ВИЧ-1 Q769_d22 (чувствительный к 3BNC117)). (В) Нейтрализующие активности плазмы, полученной до введения антител (preP), но с импульсным введением 0,01, 0,1, 1, 10 и 100 мкг/мл антител 10-1074 (синий) или 3BNC117 (зеленый). Нейтрализующую активность указывали в виде титров ID50 в плазме (левые колонки) и преобразовывали в концентрации антител (правые колонки) на основании измеренных значений ID50, указанных в случае (А). (С) Титры ID50 (левые колонки) и концентрации bN-Ат (правые колонки), измеренные в указанных образцах плазмы макак до (до иммунизации) и после (день) введения bN-Ат.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение основано по меньшей мере частично, на неожиданном открытии новой категории нейтрализующих антител широкого спектра действия (bN-Ат) против ВИЧ, которые могут распознавать зависимые от углеводов эпитопы, включая N-гликан комплексного типа, на gp120.

Антитела имеют важное значение для успешного действия большинства вакцин, и антитела против ВИЧ, по-видимому, являются только коррелятом профилактики в недавнем испытании вакцины против ВИЧ RV144. У некоторых инфицированных ВИЧ-1 пациентов развивалась нейтрализующая серологическая активность широкого спектра действия против вирусного шипа gp160 через 2-4 года после инфекции, но такие антитела обычно не защищали инфицированных людей, поскольку аутологичные вирусы ускользали вследствие мутации. Тем не менее, широкая нейтрализующая активность создает давление отбора на вирус, и пассивный перенос широко нейтрализующих антител (bN-Ат) макакам защищает от инфекции SHIV. Поэтому было высказано предположение, что вакцины, которые вызывают такие антитела, могут защищать людей от ВИЧ-инфекции.

Разработка способов клонирования антител в отдельных клетках показала, что мишенью bN-Ат являются разные эпитопы на шипе gp160 ВИЧ-1. Наиболее эффективные bN-Ат против ВИЧ-1 распознают сайт связывания CD4 (CD4bs) (Science 333(6049): 1633-1637; Nature 477(7365): 466-470; Science 334(6060): 1289-1293) и зависимые от углеводов эпитопы, связанные с вариабельными петлями (Nature 477(7365):466-470; Science 326 (5950) :285-289; Science 334(6059): 1097-1103; Nature 480 (7377) :336-343), включая петли V1/V2 (PG9/PG16) (Science 326(5950): 285-289) и V3 (PGT) (Nature 477(7365): 466-470). О зависимых от углеводов эпитопах известно меньше, поскольку антитела, исследованные до настоящего времени, являются либо уникальными примерами, либо представителями небольших клональных семейств.

Чтобы лучше понять ответ в виде нейтрализующих антител на ВИЧ-1 и эпитоп, являющийся мишенью PGT-антител, авторы выделили представителей большого клонального семейства, преобладающего при вторичном иммунном ответе в виде gp160-специфичного IgG, из организма пациента, инфицированного вирусами кланды А, который продуцировал PGT121. Как описано в настоящей публикации, антитела PGT121 делятся на две группы, группу P6T121-подобных и 10-1074-подобных антител, в соответствии с последовательностью, аффинностью связывания, нейтрализующей активностью и распознаванием углеводов и петли V3. 10-1074 и родственные представители семейства вызывают необычную эффективную нейтрализацию, включая широкую реактивность против вновь передаваемых вирусов. В отличие от ранее охарактеризованных зависимых от углеводов bN-Ат, PGT121 связывается с N-гликанами комплексного типа, а не с N-гликанами с высоким содержанием маннозы в экспериментах с использованием микроматриц гликанов. Кристаллические структуры PGT121 и 10-1074, сравниваемые со структурами их предшественника зародышевой линии и структурой PGT121, связанного с N-гликаном комплексного типа, объясняют их различные свойства.

В одном примере осуществляли анализы для выделения В-клеточных клонов, кодирующих антитело PGT121, которое является уникальным среди гликан-зависимых bN-Ат в отношении распознавания N-

гликанов комплексного типа, а не N-гликанов с высоким содержанием маннозы. Клоны PGT121 разделяются на PGT121- и 10-1074-подобные группы, отличающиеся по последовательности, аффинности связывания, распознаванию углеводов и нейтрализующей активности. Группа 10-1074 обладает заметной эффективностью и широким спектром действия, несмотря на отсутствие регистрируемого связывания с гликанами, свободными от белков. Кристаллические структуры не связанного с лигандом PGT121, 10-1074, и его предшественника зародышевой линии показывают, что такое различное распознавание углеводов картируется в углублении между CDRH2 и CDRH 3, которое было занято N-гликаном комплексного типа в отдельной структуре PGT121. Обмен остатками, контактирующими с гликанами, между PGT121 и 10-1074 подтвердил важность таких остатков для нейтрализующей активности. Оболочки ВИЧ имеют разные соотношения N-гликанов с высоким содержанием маннозы и N-гликанов комплексного типа, таким образом, полученные результаты, включая первую структурную характеристику распознавания N-гликанов комплексного типа bN-антителом против ВИЧ, имеют важнейшее значение для понимания того, как антитела и, в конечном итоге, вакцины могут достигать широкой нейтрализующей активности.

Термин "антитело" (Ат) в используемом в настоящем описании смысле включает моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела и полиреактивные антитела) и фрагменты антител. Таким образом, подразумевают, что термин "антитело", который использован в любом контексте в настоящем описании, включает без ограничения любой специфично связывающийся представитель класса и/или изотипа иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD, IgE и IgM); и его биологически подходящий фрагмент или его специфично связывающийся представитель, включая без ограничения Fab, F(ab')₂, Fv и scFv (одноцепочечный или связанная единица). В данной области известно, что антитело представляет собой гликопротеид, имеющий по меньшей мере две тяжелых (H) цепи и две легких (L) цепи, взаимосвязанных дисульфидными связями, или их антигенсвязывающую часть. Тяжелая цепь состоит из вариательной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH1, CH2 и CH3). Легкая цепь состоит из вариательной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Вариательные области тяжелой и легкой цепей содержат каркасные области (FWR) и определяющие комплементарность области (CDR). Четыре области FWR являются относительно консервативными, тогда как области CDR (CDR1, CDR2 и CDR3) представляют собой гипервариательные области и распределены от NH₂-конца к COOH-концу следующим образом: FWR1, CDR1, FWR2, CDR2, FWR3, CDR3 и FWR4. Вариательные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном, тогда как в зависимости от изотипа константная область(ти) может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина.

Также в определение "антитело" как используется в настоящем описании смысле включены химерные антитела, гуманизированные антитела и рекомбинантные антитела, человеческие антитела, образованные в трансгенном животном, отличном от человека, а также антитела, выбранные из библиотек с использованием методики обогащения, доступной специалисту в данной области.

Термин "вариательные" относится к тому факту, что некоторые участки вариательных (V) доменов сильно отличаются по последовательности среди антител. V-домен опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела по отношению к его конкретному антигену. Однако вариательность неравномерно распределена на протяжении участка длиной 110 аминокислот вариательных областей. На самом деле V-области состоят из относительно инвариантных участков, называемых каркасными областями (FR) длиной 15-30 аминокислот, разделенных более короткими областями чрезвычайной вариательности, называемыми "гипервариательными областями", каждая из которых имеет длину 9-12 аминокислот. Каждая из вариательных областей нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR, в основном принимающих конформацию бета-слоя, связанных тремя гипервариательными областями, которые образуют петли, связывающие и в некоторых случаях образующие часть структуры бета-слоя. Гипервариательные области в каждой цепи удерживаются вместе в тесной близости посредством FR и с гипервариательными областями из другой цепи вносят вклад в образование антигенсвязывающего участка антител (см., например, публикацию Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Термин "гипервариательная область" в используемом в настоящем описании смысле относится к аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывание антигена. Гипервариательная область обычно содержит аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области" ("CDR").

Термин "моноклональное антитело" в используемом в настоящем описании смысле относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в минорных количествах. Термин "поликлональное антитело" относится к препаратам, которые включают разные антитела, направленные против разных детерминант ("эпитопов").

Моноклональные антитела согласно настоящему изобретению включают "химерные" антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последователь-

ностям в антителах, полученных от конкретного вида, или относящихся к конкретному классу или подклассу антител, при этом остальная часть цепи (цепей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от другого вида или относящихся к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, при условии, что они проявляют требуемую биологическую активность (см., например, патент США No. 4816567 и публикации Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)). В описанном изобретении предлагаются антигенсвязывающие последовательности варибельной области, полученные из антител человека. Соответственно, химерные антитела, представляющие основной интерес, согласно настоящему изобретению включают антитела, имеющие одну или несколько антигенсвязывающих последовательностей человека (например, CDR) и содержащие одну или несколько последовательностей, полученных из антитела животного, отличного от человека, например, последовательность FR или С-области. Кроме того, химерные антитела, включенные в настоящее изобретение представляют собой антитела, содержащие антигенсвязывающую последовательность варибельной области человека одного класса или подкласса антител другую последовательность, например, последовательность FR или С-область, полученную из другого класса или подкласса антител.

Обычно считают, что "гуманизированным антителом" является антитело человека, которое имеет один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из источника, которое является животным, отличным от человека. Такие аминокислотные остатки животного, отличного от человека, часто называют "импортируемыми" остатками, которые обычно взяты из "импортируемой" варибельной области. Гуманизацию можно осуществить, следуя описанию Winter и соавторов (см., например, Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)), заменяя импортируемыми последовательностями гиперварибельной области соответствующие последовательности антитела человека. Соответственно, такие "гуманизированные" антитела являются химерными антителами (см., например, патент США № 4816567), в которых значительно меньшую часть, чем интактная варибельная область человека заменяют соответствующей последовательностью вида, отличного от человека.

"Фрагмент антитела" содержит часть интактного антитела, такую как антигенсвязывающая или варибельная область интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают без ограничения фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диантитела; линейные антитела (см., например, патент США № 5641870; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); одноцепочечные молекулы антител; и полиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

"Fv" означает минимальный фрагмент антитела, который содержит полный участок распознавания антигена и связывания антигена. Такой фрагмент содержит димер из одной варибельной области тяжелой цепи и одной варибельной области легкой цепи в тесной нековалентной ассоциации. В результате фолдинга указанных двух доменов возникают шесть гиперварибельных петель (по три петли из каждой H- и L-цепи), которые обеспечивают аминокислотные остатки для связывания антигена и придают антителу специфичность в связывании антигена. Однако даже одна варибельная область (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичные по отношению к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем полный участок связывания.

"Одноцепочечный Fv" ("sFv" или "scFv") означает фрагменты антител, которые содержат домены антитела VH и VL, связанные в одной полипептидной цепи. Полипептид sFv может дополнительно содержать полипептидный линкер между доменами VH и VL, который обеспечивает способность sFv образовывать требуемую структуру для связывания антигена. Обзор, касающийся sFv, см., например, в публикациях Pluckthun, в The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Vogrebaeck 1995, ниже.

Термин "диантитела" относится к небольшим фрагментам антител, полученным в результате конструирования фрагментов sFv с короткими линкерами (примерно 5-10 остатков) между доменами VH и VL, так что достигается межцепочечное, но не внутрицепочечное спаривание V-доменов, что приводит к получению бивалентного фрагмента, т.е., фрагмента, имеющего два антигенсвязывающих участка. Биспецифичные диантитела являются гетеродимерами, состоящими из двух "кроссоверных" sFv-фрагментов, в которых домены VH и VL двух антител присутствуют на разных полипептидных цепях. Диантитела описаны более полно, например, в EP 404097; WO 93/11161; и в публикации Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

Доменные антитела (dAb), которые могут быть получены в полностью человеческой форме, являются наименьшими известными антигенсвязывающими фрагментами антител, в диапазоне примерно от 11 кДа до примерно 15 кДа. Dab являются устойчивыми варибельными областями тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов (VH и VL, соответственно). Они в высокой степени экспрессируются в культуре клеток микроорганизмов, проявляют подходящие биофизические свойства, включая, например, без ограничения, растворимость и стабильность к температуре и хорошо подходят для селекции и созревания аффинности in vitro, например, в фаговом дисплее. Dab являются биологически активными в качестве мономеров и вследствие их небольшого размера и присущей им стабильности могут быть представлены в форме более крупных молекул, чтобы создать лекарственные средства с более длительным време-

нем полужизни в сыворотке или другими фармакологическими активностями. Примеры такой методики были описаны, например, в W09425591 для антител, полученных из тяжелой цепи Ig верблюдовых, а также в US20030130496, где описано выделение однодоменных полностью человеческих антител из фоговых библиотек.

Fv и sFv являются единственными видами с интактными антигенсвязывающими участками, которые лишены константных областей. Таким образом, они подходят для пониженного неспецифического связывания во время применения *in vivo*. Могут быть сконструированы слитые белки sFv для получения слияния с эффекторным белком либо на амино-, либо на карбоксильном конце sFv. См., например, *Antibody Engineering*, ed. Votgebaeck, выше. Фрагмент антитела также может представлять собой "линейное антитело", которое описано, например, в патенте США № 5641870. Такие линейные фрагменты антител могут быть моноспецифичными или биспецифичными.

В некоторых вариантах антитела согласно описанному изобретению, являются биспецифичными или полиспецифичными. Биспецифичные антитела представляют собой антитела, которые обладают специфичностями связывания по меньшей мере для двух разных эпитопов. Примеры биспецифичных антител могут связываться с двумя разными эпитопами одного антигена. В других антителах могут быть объединены первый антигенсвязывающий участок с участком связывания для второго антигена. Альтернативно, анти-ВИЧ-плечо можно объединять с плечом, которое связывается с иницирующей молекулой на лейкоците, такой как молекула Т-клеточного рецептора (например, CD3) или Fc-рецепторы в случае IgG (Fc-гамма R), такие как Fc-гамма RI (CD64), Fc-гамма RII (CD32) и Fc-гамма RIII (CD 16), для того, чтобы сфокусировать и локализовать механизмы клеточной защиты на инфицированной клетке. Биспецифичные антитела также можно использовать для локализации цитотоксических средств в инфицированных клетках. Биспецифичные антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифичных F(ab')₂-антител). Например, в WO 96/16673 описано биспецифичное анти-ErbB2/анти-Fc гамма RIII-антитело, и в патенте США № 5837234 раскрыто биспецифичное анти-ErbB2/анти-Ec гамма RI-антитело. Например, биспецифичное анти-ErbB2/Fc-альфа-антитело описано в WO98/02463; в патенте США № 5821337 описано биспецифичное анти-ErbB2/анти-CD3-антитело. См. также, например, публикации Mouquet et al., *Polyreactivity Increases The Apparent Affinity Of Anti-HIV Antibodies By Heterologation*. *Nature*. 467, 591-5 (2010), and Mouquet et al., *Enhanced HIV-1 neutralization by antibody heterologation*" *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012 Jan 17;109 (3) :875-80.

Способы получения биспецифичных антител известны в данной области. Традиционное получение полноразмерных биспецифичных антител основано на коэкспрессии двух пар тяжелая цепь-легкая цепь иммуноглобулина, при этом две цепи имеют разные специфичности (см., например, Millstein et al., *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Сходные способы описаны, например, в WO 93/08829, Trauneker et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991), а также см. Mouquet et al., *Enhanced HIV-1 neutralization by antibody heterologation*" *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012 Jan 17;109(3):87 5-80.

Альтернативно переменные области антител с требуемыми специфичностями связывания (участки связывания антитело-антиген) сливают с последовательностями константных доменов иммуноглобулина. Слияние осуществляют с константным доменом тяжелой цепи Ig, содержащим по меньшей мере часть шарнирной области, областей CH2 и CH3. Согласно некоторым вариантам осуществления первая константная область тяжелой цепи (CH1), содержащая сайт, необходимый для связывания легкой цепи, присутствует по меньшей мере в одном из слияний. ДНК, кодирующие слияния тяжелой цепи иммуноглобулина и в случае необходимости легкой цепи иммуноглобулина, встраивают в отдельные векторы экспрессии и котрансфицируют в подходящую клетку-хозяина. Это дает большую гибкость при корректировке взаимных соотношений трех полипептидных фрагментов в таких вариантах, когда неравные соотношения трех полипептидных цепей, используемых в конструкции, дают оптимальный выход требуемого биспецифичного антитела. Однако можно встраивать кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один вектор экспрессии в том случае, когда экспрессия, по меньшей мере, двух полипептидных цепей в равных соотношениях дает высокие выходы или когда соотношения не оказывают значимого влияния на выход требуемого сочетания цепей.

Способы создания биспецифичных антител из фрагментов антител также описаны в литературе. Например, биспецифичные антитела могут быть получены с использованием химического связывания. Например, Brennan et al. (*Science*, 229: 81 (1985)) описывают способ, при котором интактные антитела протеолитически расщепляют, чтобы создать F(ab')₂-фрагменты. Полученные фрагменты восстанавливают в присутствии селенита, образующего комплексы дитиола, арсенита натрия, чтобы стабилизировать соседние дитиолы и предотвратить образование межмолекулярного дисульфида. Затем созданные Fab'-фрагменты превращают в производные тионитробензоата (TNB). Один из Fab'-TNB-производных затем снова превращают в Fab'-тиол восстановлением с использованием меркаптоэтиламина и смешивают с эквимольным количеством другого Fab'-TNB-производного с образованием биспецифичного антитела. Полученные биспецифичные антитела можно использовать в качестве агентов для избирательной иммунизации ферментов.

В настоящем изобретении предполагаются другие модификации антител. Например, антитело может быть связано с одним из множества небелковых полимеров, например полиэтиленгликолем, поли-

пропиленгликолем, полиоксиалкиленами или сополимерами полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля. Антитело также может быть заключено в микрокапсулы, полученные, например, способами коацервации или полимеризацией на границе фаз (например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатиновые микрокапсулы и микрокапсулы из поли(метилметакрилата), соответственно), в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие способы описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980).

Обычно антитела согласно описанному изобретению получают рекомбинантно, используя векторы и способы, доступные в данной области. Антитела человека также могут быть созданы активированными *in vitro* В-клетками (см., например, патенты США № 5567610 и 5229275). Общие способы молекулярной генетики и геной инженерии, применимые в настоящем изобретении, описаны в современных изданиях Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, Vol. 185, edited by D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, CA), "Guide to Protein Purification" in Methods in Enzymology (M.P. Deutscher, ed., (1990) Academic Press, Inc.); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, et al. 1990. Academic Press, San Diego, CA), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2nd Ed. (R.I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, NY), and Gene Transfer and Expression Protocols, pp. 109-128, ed. E.J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, N.J.). Реагенты, векторы для клонирования и наборы для генетической обработки доступны от коммерческих поставщиков, таких как BioRad, Stratagene, Invitrogen, ClonTech и Sigma Aldrich Co.

Антитела человека также могут быть получены в трансгенных животных (например, мышах), которые способны продуцировать полный репертуар антител человека в отсутствие продукции эндогенных иммуноглобулинов. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена соединяющей области тяжелой цепи (JH) антитела у химерных и мутантных по зародышевой линии мышей приводит к полному ингибированию продукции эндогенных антител. Перенос ряда генов иммуноглобулина зародышевой линии человека в таких мутантных по зародышевой линии мышей будет приводить к продукции антител человека при антигенной стимуляции. См., например, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); патенты США № 5545806, 5569825, 5591669 (все GenPharm), патент США № 5545807 и WO 97/17852. Такие животные могут быть генетически сконструированы для получения антител человека, содержащих полипептид согласно описанному изобретению.

Были разработаны различные способы получения фрагментов антител. Традиционно такие фрагменты получали в результате протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); and Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Однако в настоящее время такие фрагменты могут непосредственно продуцироваться рекомбинантными клетками-хозяевами. Фрагменты антител Fab, Fv и ScFv могут быть экспрессированы и секретируются из *E. coli*, таким образом, обеспечивая возможность простого получения больших количеств таких фрагментов. Fab'-SH-фрагменты могут быть непосредственно извлечены из клеток *E. coli* и химически связаны с образованием F(ab')₂-фрагментов (см., например, Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). Согласно другому способу F(ab')₂-фрагменты могут быть выделены непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Fab и F(ab')₂-фрагменты с увеличенным временем полужизни *in vivo*, содержащие остатки эпитопа, связывающего рецептор спасения, описаны в патенте США № 5869046. Другие способы получения фрагментов антител будут известны специалистам в данной области.

Другие способы, которые известны в данной области для селекции фрагментов антител из библиотек с использованием методики обогащения, включая, но ими не ограничиваясь, фаговый дисплей, рибосомный дисплей (Hanes and Pluckthun, 1997, Proc. Nat. Acad. Sci. 94: 4937-4942), бактериальный дисплей (Georgiou, et al., 1997, Nature Biotechnology 15: 29-34) и/или дрожжевой дисплей (Kieckhefer, et al., 1997, Protein Engineering 10: 1303-1310) можно использовать в качестве альтернативы ранее описанным способом селекции одноцепочечных антител.

Одноцепочечные антитела отбирают из библиотеки одноцепочечных антител, полученных непосредственно с использованием методики на основе нитчатого фага. Методика фагового дисплея известна в данной области (см. методику Cambridge Antibody Technology (CAT)), которая описана в патентах США № 5565332, 5733743, 5871907, 5872215, 5885793, 5962255, 6140471, 6225447, 6291650, 6492160, 6521404, 6544731, 6555313, 6582915, 6593081, а также других патентах США или заявках, которые основаны на приоритете подачи заявки GB 9206318, поданной 24 мая 1992; см. также Vaughn, et al. 1996, Nature Biotechnology 14: 309-314). Одноцепочечные антитела также могут спроектированы и сконструированы с использованием доступной методики рекомбинации ДНК, такой как способ амплификации ДНК (например, ПЦР), или возможно с использованием соответствующей кДНК гибридомы в качестве матрицы.

Варианты антител также включены в объем изобретения. Таким образом, варианты последовательностей, перечисленные в заявке, также включены в объем изобретения. Дополнительные варианты последовательностей антител, имеющие улучшенную аффинность, могут быть получены с использованием способов, известных в данной области, и включены в объем изобретения. Например, могут быть использованы аминокислотные замены для получения антител с дополнительно улучшенной аффинностью.

Альтернативно можно использовать оптимизацию кодонов нуклеотидной последовательности, чтобы повысить эффективность трансляции в системах экспрессии для продуцирования антитела.

Последовательности таких вариантов антитела будут иметь 70% или большую (т.е., 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или больше) идентичность последовательности с последовательностями, указанными в заявке. Такую идентичность последовательностей вычисляют по отношению к полной длине эталонной последовательности (т.е., последовательности, указанной в заявке). Идентичность в процентах, которая указана в настоящем описании, определяют, применяя BLAST, версию 2.1.3, используя параметры по умолчанию, определенные NCBI (the National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov/) [матрица Blosum 62; штраф за открытие пробела = 11 и штраф за удлинение пробела = 1]. Например, в настоящем изобретении предлагаются пептидные последовательности, которые содержат по меньшей мере примерно 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 или больше непрерывно следующих друг за другом пептидов одной или нескольких последовательностей, раскрытых в настоящем описании, а также все промежуточные длины между ними. В используемом в настоящем описании смысле термин "промежуточные длины" предназначен для описания любой длины между указанными значениями, такие как 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и т.д.; 21, 22, 23, и т.д.; 30, 31, 32 и т.д.; 50, 51, 52, 53 и т.д.; 100, 101, 102, 103 и т.д.; 150, 151, 152, 153 и т.д.

Настоящее изобретение относится к антителам, либо отдельно, либо в сочетании с другими антителами, такими как, но ими не ограничиваясь, антитела VRC01, против петли V3, CD4bs и CD4i, а также PG9/PG16-подобные антитела, которые обладают широкой нейтрализующей активностью в сыворотке.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способам получения и введения композиции ВИЧ-антитела, которая подходит для введения больному человеку или примату, отличному от человека, имеющему ВИЧ-инфекцию или подвергаемому риску ВИЧ-инфекции, в количестве и в соответствии со схемой, достаточными для индукции защитного иммунного ответа против ВИЧ или уменьшения количества вируса ВИЧ у человека.

Согласно другому варианту настоящее изобретение относится к вакцине, содержащей по меньшей мере одно антитело согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Согласно одному варианту осуществления вакцина представляет собой вакцину, содержащую по меньшей мере одно антитело, описанное в настоящей публикации, и фармацевтически приемлемый носитель. Вакцина может содержать множество антител, имеющих описанные в настоящей публикации характеристики, в любом сочетании и может дополнительно содержать антитела, нейтрализующие ВИЧ, которые известны в данной области.

Следует понимать, что композиции могут быть иметь одно или сочетание антител, описанных в настоящей публикации, которые могут быть одинаковыми или разными, чтобы профилактически или терапевтически лечить прогрессирование различных подтипов ВИЧ-инфекции после вакцинации. Такие сочетания могут быть выбраны в соответствии с требуемым иммунитетом. Когда антитело вводят животному или человеку, его можно сочетать с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или адьювантами, которые известны специалисту в данной области. Сочетание может дополнительно включать нейтрализующие антитела широкого спектра действия, известные в данной области, включая, но ими не ограничиваясь, антитела VRC01, b12, против петли V3, CD4bs и CD4i, а также PG9/PG16-подобные антитела.

Кроме того, что касается определения эффективного уровня у пациента для лечения ВИЧ, то в частности, доступны подходящие животные модели, и они были широко использованы для оценки эффективности *in vivo*, направленной против ВИЧ, в различных протоколах генной терапии (Sarver et al. (1993b), выше). Такие модели включают мышей, обезьян и кошек. Даже несмотря на то, что такие животные в природе не чувствительны к ВИЧ-заболеванию, химерные мышинные модели (например, SCID, bg/nu/xid, NOD/SCID, SCID-hu, иммунокомпетентные SCID-hu, BALB/c с разрушенным костным мозгом), реконструированные с использованием мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека, лимфатических узлов, фетальной печени/тимуса или других тканей, могут быть инфицированы лентивирусным вектором или ВИЧ и использованы в качестве моделей патогенеза ВИЧ. Подобным образом, можно использовать модель вирус иммунодефицита обезьян (SIV)/обезьяны, так же как модель вирус иммунодефицита кошек (FIV)/кошки. Фармацевтическая композиция может содержать другие фармацевтические средства вместе с вектором согласно изобретению в случае применения для терапевтического лечения СПИДа. Такие другие фармацевтические средства можно использовать традиционным для них образом (т.е., в качестве средств для лечения ВИЧ-инфекции).

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции на основе антител, содержащей эффективное количество выделенного ВИЧ-антитела или варианта с созревшей аффинностью, которое обеспечивает выбор профилактического или терапевтического лечения для снижения инфекции вирусом ВИЧ. Основанная на антителах фармацевтическая композиция согласно изобретению может быть получена несколькими способами, известными в данной области (например, см. McGoff and Scher, 2000, Solution Formulation of Proteins/Peptides: In McNally, E.J., ed. Protein Formulation and Delivery. New York, NY: Marcel Dekker; pp. 139-158; Akers and Defilippis, 2000, Peptides and Proteins as Parenteral Solutions. In: Pharmaceutical Formulation Development of

Peptides and Proteins. Philadelphia, PA: Talyor and Francis; pp. 145-177; Akers, et al., 2002, Pharm. Biotechnol. 14:47-127).

Фармацевтически приемлемая композиция, подходящая для введения пациенту, будет содержать эффективное количество антитела в препарате, который будет сохранять биологическую активность и при этом также обеспечивать максимальную стабильность во время хранения в приемлемом диапазоне температур. Фармацевтические композиции также могут содержать, в зависимости от требуемого препарата, фармацевтически приемлемые разбавители, фармацевтически приемлемые носители и/или фармацевтически приемлемые эксципиенты или любой такой наполнитель, обычно используемый для приготовления фармацевтических композиций для введения животным или человеку. Разбавитель выбирают так, чтобы он не влиял на биологическую активность сочетания. Примерами таких разбавителей являются дистиллированная вода, физиологический фосфатно-солевой буфер, растворы Рингера, раствор декстрозы и раствор Хэнкса. Количество эксципиента, которое применимо в фармацевтической композиции или препарате согласно настоящему изобретению, представляет собой количество, которое служит для равномерного распределения антитела в композиции, так чтобы оно было равномерно распределено в том случае, когда его доставляют в организм индивида. Он может служить для разбавления антитела до концентрации, которая обеспечивает получение требуемых полезных паллиативных или целебных результатов, в то же время минимизирует любые неблагоприятные побочные эффекты, которые могут возникать вследствие слишком высокой концентрации. Он может также оказывать действие как консервант. Таким образом, в случае антитела, обладающего высокой физиологической активностью можно использовать большее количество эксципиента. С другой стороны, в случае любого активного ингредиента(ов), который проявляет более низкую физиологическую активность, будет использовано меньшее количество эксципиента.

Описанные выше антитела и композиции антител или вакцинные композиции, содержащие по меньшей мере одно или сочетание антител, описанных в настоящей публикации, могут быть введены для профилактического и терапевтического лечения инфекции вирусом ВИЧ.

Настоящее изобретение также относится к выделенным полипептидам, содержащим новые аминокислотные последовательности легких цепей и тяжелых цепей, а также консенсусные последовательности тяжелых и легких цепей SEQ ID NO: 1 и 2, которые указаны на фиг. 3.

В других родственных вариантах осуществления изобретение относится к вариантам полипептидов, которые кодируют аминокислотные последовательности ВИЧ-антител, перечисленные на фиг. 3; консенсусные последовательности тяжелой и легкой цепей SEQ ID NO: 1 и 2. Такие варианты полипептидов имеют по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более высокую идентичность последовательности в сравнении с полипептидной последовательностью согласно настоящему изобретению, которую определяют с применением способов, описанных в настоящей публикации (например, в BLAST-анализе с использованием стандартных параметров). Специалисту в данной области будет понятно, что такие значения могут быть соответствующим образом скорректированы для определения соответствующей идентичности кодируемых белков, учитывая сходство аминокислот и тому подобное.

Термин "полипептид" используют в его обычном значении, т.е., как последовательность аминокислот. Полипептиды не ограничены конкретной длиной продукта. Пептиды, олигопептиды и белки включены в определение полипептидов, и такие термины могут быть использованы взаимозаменяемо в настоящем описании, если специально не указано иное. Такой термин также включает модификации полипептида после экспрессии, например, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и тому подобное, а также другие модификации, известные в данной области, как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе. Полипептид может представлять собой полный белок или его подпоследовательность. Представляющими особый интерес полипептидами в контексте настоящего изобретения являются аминокислотные подпоследовательности, содержащие CDR, VH и VL, способные связывать антиген или ВИЧ-инфицированную клетку.

"Вариантом" полипептида в используемом в настоящем описании смысле данного термина является полипептид, который обычно отличается от полипептида, конкретно раскрытого в настоящем описании, одной или несколькими заменами, делениями, добавлениями и/или инсерциями. Такие варианты могут встречаться в природе или могут быть созданы синтетически, например, в результате модификации одной или нескольких описанных выше полипептидных последовательностей согласно изобретению и оценки одной или нескольких биологических активностей полипептида, как описано в настоящей публикации и/или с использованием ряда способов, хорошо известных в данной области.

Например, некоторые аминокислоты могут быть заменены другими аминокислотами в структуре белка без значительной потери его способности связывать другие полипептиды (например, антигены) или клетки. Так как способность к связыванию и природа белка определяют биологическую функциональную активность белка, могут быть осуществлены некоторые замены аминокислотной последовательности в последовательности белка, и соответственно в кодирующей последовательности ДНК, лежащей в ее основе, с получением при этом белка с подобными свойствами. Таким образом предполагается, что различные изменения могут быть осуществлены в пептидных последовательностях заявленных композиций или соответствующих последовательностях ДНК, которые кодируют указанные пептиды без

существенной потери их биологической пользы или активности.

Во многих случаях вариант полипептида будет содержать одну или несколько консервативных замен. "Консервативная замена" представляет собой замену, при которой аминокислоту заменяют другой аминокислотой, которая обладает сходными свойствами, так что специалист в области химии пептидов может ожидать, что вторичная структура и гидропатическая природа полипептида существенно не изменится.

Аминокислотные замены обычно основаны на относительном сходстве заместителей боковых цепей аминокислот, например, их гидрофобности, гидрофильности, заряда, размера и тому подобного. Примеры замен, при которых учитывают указанные выше характеристики, хорошо известны специалистам в данной области и включают: аргинин и лизин; глутамат и аспарат; серин и треонин; глутамин и аспарагин; и валин, лейцин и изолейцин.

"Гомология" или "идентичность последовательностей" относится к процентному содержанию остатков в варианте полинуклеотидной или полипептидной последовательности, которые идентичны инвариантной последовательности после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если это необходимо для достижения максимальной гомологии в процентах. В конкретных вариантах осуществления изобретения полинуклеотидные и полипептидные варианты имеют по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 98% или по меньшей мере примерно 99% гомологию полинуклеотидов или полипептидов с полинуклеотидом или полипептидом, описанным в настоящей публикации.

Такие варианты полипептидной последовательности будут иметь 70% или более высокую (т.е., 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или более высокую) идентичность последовательности с последовательностями, указанными в заявке. В дополнительных вариантах описанное изобретение относится к фрагментам полипептидов, имеющим различные длины непрерывных участков аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем описании. Например, в настоящем изобретении предлагаются пептидные последовательности, которые содержат по меньшей мере примерно 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 или больше непрерывно следующих друг за другом пептидов одной или нескольких последовательностей, раскрытых в настоящем описании, а также все промежуточные длины между ними.

Изобретение также относится к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим часть или все легкие и тяжелые цепи описанных антител согласно изобретению и их фрагментов. Вследствие вырожденности генетического кода будут существовать варианты таких последовательностей, которые кодируют такие же аминокислотные последовательности.

Настоящее изобретение также относится к выделенным последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим полипептиды тяжелой и легкой цепей ВИЧ-антител, указанные на фиг. 3, и консенсусные последовательности тяжелой и легкой цепей SEQ ID NO: 1 и 2.

В других родственных вариантах описанное изобретение относится к вариантам полинуклеотидов, которые кодируют пептидные последовательности тяжелой и легкой цепей ВИЧ-антител, указанные на фиг. 3; консенсусные последовательности тяжелой и легкой цепей SEQ ID NO: 1 и 2. Такие варианты полинуклеотидов имеют по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% или более высокую идентичность последовательности в сравнении с полинуклеотидной последовательностью согласно настоящему изобретению, которую определяют, применяя способы, описанные в настоящей публикации (например, BLAST-анализ с использованием стандартных параметров). Специалисту в данной области будет понятно, что такие значения могут быть соответствующим образом скорректированы для определения соответствующей идентичности белков, кодируемых двумя нуклеотидными последовательностями, с учетом вырожденности кодонов, сходства аминокислот, расположения рамки считывания и тому подобного.

Термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" используют в настоящем описании взаимозаменяемо по отношению к одонитевой или двунитевой РНК, ДНК или смешанным полимерам. Полинуклеотиды могут содержать геномные последовательности, внегеномные и плазмидные последовательности и более мелкие сконструированные участки генов, которые экспрессируют или могут быть адаптированы для экспрессии полипептидов.

"Выделенная нуклеиновая кислота" представляет собой нуклеиновую кислоту, которая по существу отделена от других геномных последовательностей ДНК, а также белков или комплексов, таких как рибосомы и полимеразы, которые в природе сопровождают нативную последовательность. Термин охватывает последовательность нуклеиновой кислоты, которая была извлечена из ее природного окружения, и включает рекомбинантные или клонированные изоляты ДНК и химически синтезированные аналоги или аналоги, синтезированные биологически в гетерологичных системах. По существу чистая нуклеиновая кислота включает выделенные формы нуклеиновой кислоты. Соответственно, это относится к нуклеиновой кислоте, которая исходно выделена и не исключает гены или последовательности, добавленные позднее к выделенной нуклеиновой кислоте искусственно.

Термин "вариант" полинуклеотида в используемом в настоящем описании смысле, представляет собой полинуклеотид, который обычно отличается от полинуклеотида, в частности, раскрытого в на-

стоящем описании, одной или несколькими заменами, делениями, добавлениями и/или инсерциями. Такие варианты могут встречаться в природе или могут быть созданы в результате синтеза, например, за счет модификации одной или нескольких полинуклеотидных последовательностей согласно изобретению и оценки одной или нескольких биологических активностей кодируемого полипептида, как описано в настоящей публикации и/или с использованием любого из ряда способов, хорошо известных в данной области.

В структуре полинуклеотидов согласно описанному изобретению можно осуществить модификации и при этом все еще получить функциональную молекулу, которая кодирует вариант или производное полипептида с требуемыми характеристиками. В том случае, когда требуется изменить аминокислотную последовательность полипептида для создания эквивалента или даже улучшенного варианта или части полипептида согласно изобретению, специалист в данной области обычно может изменить один или несколько кодонов кодирующей последовательности ДНК.

Обычно варианты полинуклеотидов содержат одну или несколько замен, добавлений, делеций и/или инсерций, так чтобы иммуногенные связывающие свойства полипептида, кодируемого вариантом полинуклеотида, существенно не снижались по сравнению с полипептидом, кодируемым полинуклеотидной последовательностью, конкретно указанной в настоящем описании.

В дополнительных вариантах осуществления описанное изобретение относится к фрагментам полинуклеотидов, содержащим имеющие разные длины непрерывные участки последовательности, идентичной или комплементарной одной или нескольким последовательностям, описанным в настоящей публикации. Например, в настоящем изобретении предлагаются полинуклеотиды, которые содержат по меньшей мере примерно 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 или 1000 или больше непрерывно следующих друг за другом нуклеотидов одной или нескольких последовательностей, описанных в настоящей публикации, при этом также включены все промежуточные длины и любая длина между указанными значениями, например, 16, 17, 18, 19 и т.д.; 21, 22, 23 и т.д.; 30, 31, 32 и т.д.; 50, 51, 52, 53 и т.д.; 100, 101, 102, 103 и т.д.; 150, 151, 152, 153 и т.д.; и включая все целые числа в диапазонах 200-500; 500-1000.

В другом варианте осуществления изобретения предлагаются полинуклеотидные композиции, которые способны гибридизоваться в условиях от умеренной до высокой жесткости с полинуклеотидной последовательностью, предлагаемой в настоящем изобретении, или ее фрагментом или комплементарной ей последовательностью. Способы гибридизации хорошо известны в области молекулярной биологии. В целях иллюстрации, подходящие условия умеренной жесткости для проверки гибридизации полинуклеотида согласно настоящему изобретению с другими полинуклеотидами включают предварительную промывку в растворе $5\times$ SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0); гибридизацию при 50-6°C, $5\times$ SSC, в течение ночи; последующую промывку два раза при 65°C по 20 минут $2\times$, $0,5\times$ и $0,2\times$ SSC, содержащим 0,1% SDS. Специалисту в данной области будет понятно, что жесткостью гибридизации можно легко манипулировать, например, изменяя содержание соли в растворе для гибридизации и/или температуру, при которой осуществляют гибридизацию. Например, в другом варианте подходящие условия гибридизации высокой жесткости включают условия, описанные выше, за исключением того, что температура гибридизации повышена, например, до 60-65°C или 65-70°C.

В некоторых вариантах осуществления полипептид, кодируемый вариантом полинуклеотида или фрагментом, имеет такую же специфичность связывания (т.е., специфично или предпочтительно связывается с таким же эпитопом или штаммом ВИЧ), что и полипептид, кодируемый нативным полинуклеотидом. В некоторых вариантах описанные полинуклеотиды, варианты полинуклеотидов, фрагменты и гибридизующиеся последовательности кодируют полипептиды, которые имеют уровень активности связывания, составляющий по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 70% и, по меньшей мере примерно 90% от уровня для полипептидной последовательности, конкретно указанной в настоящем описании.

Полинуклеотиды согласно описанному изобретению или их фрагменты, независимо от длины самой кодирующей последовательности, могут быть объединены с другими последовательностями ДНК, такими как промоторы, сигналы полиаденилирования, дополнительные участки для ферментов рестрикции, сайты множественного клонирования, другие кодирующие участки и тому подобное, так что их общая длина может сильно варьировать. Можно использовать фрагмент нуклеиновой кислоты почти любой длины. Например, иллюстративные участки полинуклеотидов с общей длиной примерно 10000, примерно 5000, примерно 3000, примерно 2 000, примерно 1000, примерно 500, примерно 200, примерно 100, примерно 50 пар оснований и тому подобные (включая все промежуточные длины) включены во множество вариантов осуществления настоящего изобретения.

Кроме того, в объем изобретения включены векторы, такие как векторы экспрессии, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты согласно изобретению. Клетки, трансформированные такими векторами, также включены в объем изобретения.

Настоящее изобретение также относится к векторам и клеткам-хозяевам, содержащим нуклеиновую кислоту согласно изобретению, а также рекомбинантным способам получения полипептида изобретения. Векторы согласно изобретению включают векторы, способные реплицироваться в любом типе клеток

или организма, включая, например, плазмиды, фаг, космиды и минихромосомы. В некоторых вариантах осуществления векторы, содержащие полинуклеотид согласно описанному изобретению, представляют собой векторы, подходящие для размножения или репликации полинуклеотида, или векторы, подходящие для экспрессии полипептида согласно описанному изобретению. Такие векторы известны в данной области и коммерчески доступны.

"Вектор" включает челночные векторы и векторы экспрессии. Обычно конструкция плазмиды также будет включать начало репликации (например, начало репликации ColE1) и селективируемый маркер (например, резистентность к ампициллину или тетрациклину) для репликации и селекции, соответственно, плазмид в бактериях. "Вектор экспрессии" относится к вектору, который содержит необходимые регуляторные последовательности или регуляторные элементы для экспрессии антител, включая фрагмент антитела согласно изобретению, в бактериальных или эукариотических клетках.

Как используется в настоящем описании термин "клетка" может означать любую клетку, включая, но этим не ограничиваясь, клетку эукариотического многоклеточного вида (например, в противоположность одноклеточным дрожжам), такую как без ограничения клетка млекопитающего или клетка человека. Клетка может представлять собой один объект или может быть частью более крупной группы клеток. Такая "более крупная группа клеток" может включать, например, культуру клеток (либо смешанную, либо чистую), ткань (например, эндотелиальную, эпителиальную, слизистую или другую ткань), орган (например, легкое, печень, мышцы и другие органы), систему органов (например, кровеносную систему, дыхательную систему, пищеварительную систему, мочевую систему, нервную систему, покровы или другую систему органов) или организм (например, птицу, млекопитающего или тому подобное).

Полинуклеотиды согласно изобретению могут быть синтезированы как целое или в виде частей, которые затем объединяют, и встроены в вектор с использованием обычных способов молекулярной и клеточной биологии, включая, например, субклонирование полинуклеотида в линейаризованном векторе с использованием подходящих сайтов рестрикции и ферментов рестрикции. Полинуклеотиды согласно описанному изобретению амплифицируют в полимеразной цепной реакции, используя олигонуклеотидные праймеры, комплементарные каждой из нитей полинуклеотида. Такие праймеры также включают сайты расщепления ферментами рестрикции для облегчения субклонирования в векторе. Компоненты реплицируемого вектора обычно включают без ограничения один или несколько из следующих компонентов: сигнальную последовательность, начало репликации и один или несколько маркерных или селективируемых генов.

Чтобы экспрессировать полипептид согласно изобретению, нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептид или функциональные эквиваленты, могут быть встроены в подходящий вектор экспрессии, т.е., вектор, который содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции встроеной кодирующей последовательности. Способы, хорошо известные специалистам в данной области, можно использовать для конструирования векторов экспрессии, содержащих последовательности, кодирующие представляющий интерес полипептид, и подходящие элементы регуляции транскрипции и трансляции. Такие способы включают способы рекомбинации ДНК *in vitro*, способы синтеза и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Такие способы описаны, например, в Sambrook, J., et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., and Ausubel, F. M. et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.

Настоящее изобретение также относится к наборам, используемым для осуществления диагностических и прогностических анализов с использованием антител, полипептидов и нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Наборы согласно настоящему изобретению включают подходящую емкость, содержащую ВИЧ-антитело, полипептид или нуклеиновую кислоту согласно изобретению либо в меченой, либо в немеченой форме. Кроме того, когда антитело, полипептид или нуклеиновую кислоту поставляют в меченой форме, подходящей для непрямого анализа связывания, набор дополнительно содержит реагенты для осуществления соответствующего непрямого анализа. Например, набор может включать одну или несколько подходящих емкостей, содержащих субстраты ферментов или дериватизирующие средства, в зависимости от природы метки. Также могут быть включены контрольные образцы и/или инструкции. Настоящее изобретение также относится к наборам для выявления присутствия ВИЧ-антител или нуклеотидной последовательности для ВИЧ-антитела согласно настоящему изобретению в биологическом образце с использованием ПЦР или масс-спектрометрии.

"Метка" в используемом в настоящем описании смысле относится к регистрируемому соединению или композиции, которую конъюгируют прямо или опосредованно с антителом так, чтобы создать "меченое" антитело. Метка также может быть конъюгирована с полипептидной последовательностью и/или последовательностью нуклеиновой кислоты, раскрытой в настоящем описании. Метка может быть выявлена как таковая (например, радиоизотопные метки или флуоресцирующие метки) или, в случае ферментативной метки, может катализировать химическое изменение соединения или композиции субстрата, которое можно регистрировать. Антитела и полипептиды согласно описанному изобретению также могут быть модифицированы так, чтобы они включали эпитопную метку, например, для применения при очистке или диагностике. Подходящие средства выявления включают использование меток, таких как, но ими не ограничиваясь, радионуклиды, ферменты, коферменты, флуоресцирующие вещества, хемиллю-

минесцентные вещества, хромогены, субстраты ферментов или кофакторы, ингибиторы ферментов, комплексы протетических групп, свободные радикалы, частицы, красители и тому подобное.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к диагностическим способам.

Диагностические способы обычно включают приведение биологического образца, полученного от пациента, такого как, например, кровь, сыворотка, слюна, моча, мокрота, мазок клеток или биопсия ткани, в контакт с ВИЧ-антителом и определение того, связывается ли антитело предпочтительно с образцом, который сравнивают с контрольным образцом или предварительно определяемым значением отсеивания, таким образом определяя наличие ВИЧ-вируса.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способам выявления присутствия ВИЧ-антител согласно настоящему изобретению в биологическом образце, полученном от пациента. Способы выявления обычно включают получение биологического образца от пациента, такого как, например, кровь, сыворотка, слюна, моча, мокрота, мазок клеток или биопсия ткани, и выделение ВИЧ-антител или их фрагментов или нуклеиновых кислот, которые кодируют ВИЧ-антитело, и анализ присутствия ВИЧ-антитела в биологическом образце. Также настоящее изобретение относится к способам выявления нуклеотидной последовательности ВИЧ-антитела в клетке. Нуклеотидная последовательность ВИЧ-антитела также может быть выявлена с использованием праймеров, описанных в настоящей публикации. Присутствие ВИЧ-антитела в биологическом образце от пациента можно определить, используя известные способы рекомбинации и/или с применением масс-спектрометра.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу выявления в биологическом образце ВИЧ-антитела, содержащего тяжелую цепь, которая содержит высоко консервативную консенсусную последовательность, и легкую цепь, содержащую высоко консервативную консенсусную последовательность, включающему получение содержащего иммуноглобулины биологического образца от индивида млекопитающего, выделение ВИЧ-антитела из указанного образца и идентификацию высоко консервативных консенсусных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи. Биологическим образцом может быть кровь, сыворотка, слюна, моча, мокрота, мазок клеток или биопсия ткани. Аминокислотные последовательности могут быть определены способами, известными в данной области, включая, например, ПЦР и масс-спектрометрию.

Термин "оценка" включает любую форму измерения и включает определение того, присутствует ли элемент или отсутствует. Термины "определение", "измерение", "оценивание", "оценка" и "анализ" используют взаимозаменяемо, и они включают количественные и качественные определения. Оценивание может быть относительной или абсолютной. Оценка присутствия включает определение количества того, что присутствует, и/или определение того, присутствует ли это или отсутствует. В используемом в настоящем описании смысле термины "определение", "измерение" и "оценка" и "анализ" используют взаимозаменяемо, и термины включают как количественные, так и качественные определения.

II. Способ снижения репликации вируса.

Кроме того, предлагаются способы уменьшения повышения титра вируса ВИЧ, репликации вируса, пролиферации вируса или количества белка вируса ВИЧ у индивида. Согласно другому аспекту способ включает введение индивиду количества ВИЧ-антитела, эффективного в отношении уменьшения повышения титра ВИЧ, репликации вируса или количества белка ВИЧ одного или нескольких штаммов или изолятов ВИЧ у индивида.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу снижения репликации вируса или распространения ВИЧ-инфекции в дополнительные клетки-хозяева или ткани, включающему осуществление контакта клетки млекопитающего с антителом или его частью, которая связывает антигенный эпитоп на gp120.

III. Способ лечения.

Согласно другому варианту настоящее изобретение относится к способу лечения млекопитающего, инфицированного вирусом, таким как, например, ВИЧ, включающему введение указанному млекопитающему фармацевтической композиции, содержащей ВИЧ-антитела, раскрытые в настоящей публикации. Согласно одному из вариантов осуществления способ лечения млекопитающего, инфицированного ВИЧ, включает введение указанному млекопитающему фармацевтической композиции, которая содержит антитело согласно настоящему изобретению или его фрагмент. Композиции согласно изобретению могут содержать более одного антитела, имеющему описанные характеристики (например, множество или пул антител). Композиция также может содержать другие антитела, нейтрализующие ВИЧ, которые известны в данной области, например, но ими не ограничиваясь, VRC01, PG9 и b12.

Пассивная иммунизация оказалась эффективной и безопасной методикой профилактики и лечения вирусных заболеваний (см., например, Keller et al., Clin. Microbiol. Rev. 13:602-14 (2000); Casadevall, Nat. Biotechnol. 20: 114 (2002); Shibata et al., Nat. Med. 5:204-10 (1999); and Igarashi et al., Nat. Med. 5:211-16 (1999)). Пассивная иммунизация с использованием моноклональных антител человека обеспечивает методику немедленного лечения для экстренной профилактики и лечения ВИЧ.

Индивиды, подвергаемые риску развития связанных с ВИЧ заболеваний или расстройств, включают пациентов, которые контактировали с инфицированным человеком или которые подверглись воздей-

вию ВИЧ каким-либо другим путем. Введение профилактического средства может быть осуществлено до проявления симптомов, характерных для связанного с ВИЧ заболевания или расстройства, с тем, чтобы предотвратить заболевание или расстройство, или альтернативно замедлить его прогрессирование.

В случае лечения *in vivo* больных людей или больных животных, отличных от человека, пациенту вводят или дают фармацевтический препарат, содержащий ВИЧ-антитело согласно изобретению. При использовании для терапии *in vivo* антитела согласно изобретению вводят пациенту в терапевтически эффективных количествах (т.е., в количествах, которые элиминируют или снижают вирусную нагрузку у пациента). Антитела вводят больному человеку известными способами, такими как внутривенное введение, например, в виде болюса или посредством непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, внутримышечным, внутривентральным, интрацеребральным, подкожным, внутрисуставным, интрасиновиальным, интратекальным, глазным, местным или ингаляционным путями. Антитела могут быть введены парентерально, когда это возможно, в участок клеток-мишеней или внутривенно. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят путем внутривенного или подкожного введения. Терапевтические композиции согласно изобретению могут быть введены пациенту или индивиду системно, парентерально или местно. Указанные выше параметры оценки успешного лечения и улучшения состояния при заболевании, легко можно измерить обычными способами, известными лечащему врачу.

В случае парентерального введения антитела могут быть получены в стандартной лекарственной инъекционной форме (раствор, суспензия, эмульсия) в ассоциации с фармацевтически приемлемым парентеральным наполнителем. Примеры таких наполнителей включают, но ими не ограничиваются, воду, физиологический раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и 5% сывороточный альбумин человека. Неводные наполнители включают без ограничения нелетучие масла и этилолеат. В качестве носителей можно использовать липосомы. наполнитель может содержать минорные количества добавок, таких как вещества, которые повышают изотоничность и химическую стабильность, такие как, например, буферы и консерванты. Антитела могут быть приготовлены в таких наполнителях в концентрациях примерно от 1 мг/мл до 10 мг/мл.

Доза и схема дозирования зависит от множества факторов, легко определяемых лечащим врачом, таких как, например, природа инфекция, его терапевтического индекса, пациента и истории болезни пациента. В общем, пациенту вводят терапевтически эффективное количество антитела. В некоторых вариантах количество вводимого антитела находится в диапазоне примерно от 0,1 мг/кг до примерно 50 мг/кг массы тела пациента. В зависимости от типа и тяжести инфекции начальная выбираемая доза антитела для введения пациенту составляет примерно от 0,1 мг/кг до примерно 50 мг/кг массы тела (например, примерно 0,1-15 мг/кг/дозу), вводимая с использованием либо одного, либо нескольких отдельных введений или посредством непрерывной инфузии. Успех такой терапии легко контролировать обычными способами и анализами и на основании критериев, известных лечащему врачу или другому специалисту в данной области. Указанные выше параметры оценки успешного лечения и улучшения состояния при заболевании легко можно измерить обычными способами, известными лечащему врачу.

Другие терапевтические схемы можно комбинировать с введением ВИЧ-антитела согласно настоящему изобретению.

Комбинированное введение включает совместное введение с использованием отдельных препаратов или одного фармацевтического препарата и последовательное введение в любом порядке, при этом предпочтительно имеется период времени, когда оба (или все) активные средства одновременно проявляют свои биологические активности. Такая комбинированная терапия может приводить к синергетическому терапевтическому эффекту. Указанные выше параметры оценки успешного лечения и улучшения состояния при заболевании легко можно измерить обычными способами, известными лечащему врачу.

Термины "процесс лечения" или "лечение" или "облегчение" относятся как терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам; при этом цель заключается в предотвращении или замедлении (уменьшении) целевого патологического состояния или расстройства. Нуждающимися в лечении являются те пациенты, которые уже имеют расстройство, а также те, которые предрасположены к возникновению расстройства, или те, у которых расстройство необходимо предотвратить. Индивида или млекопитающего успешно "лечат" по поводу инфекции, если после получения терапевтического количества антитела согласно способам, предлагаемым в настоящем изобретении, у пациента имеется наблюдаемое и/или измеряемое снижение или отсутствие одного или нескольких из следующих показателей: уменьшение количества инфицированных клеток или отсутствие инфицированных клеток; снижение общего процента клеток, которые инфицированы; и/или облегчение, в некоторой степени, одного или нескольких симптомов, ассоциированных с конкретной инфекцией; снижение заболеваемости и смертности и улучшение качества жизни. Указанные выше параметры оценки успешного лечения и улучшения состояния при заболевании легко можно измерить обычными способами, известными лечащему врачу.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству антитела или лекарственного средства, которое эффективно при лечении заболевания или расстройства у индивида или млекопитающего.

Введение "в сочетании с" одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами

включает одновременное (совпадающее по времени) и последовательное введение в любом порядке.

"Носители", как используется в настоящем описании, включают фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы, которые являются нетоксичными для клетки или млекопитающего, подвергаемого его воздействию, в применяемых дозах и концентрациях. Часто физиологически приемлемым носителем является водный раствор, забуференный по pH. Примеры физиологически приемлемых носителей включают, но ими не ограничиваются, такие буферы, как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярный (менее чем примерно 10 остатков) полипептид; белки, такие как, но ими не ограничиваясь, сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как, без ограничения, поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как без ограничения глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая, без ограничения, глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как, без ограничения, EDTA; сахарные спирты, такие как, без ограничения, маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как, без ограничения, натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как, без ограничения, твин, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и плуроники.

В том случае, когда указано значение диапазонов, следует понимать, что каждое промежуточное значение до нижнего предела десятых долей единицы, если контекст ясно не диктует иное, между верхним и нижним пределом диапазона и любое другое указанное или промежуточное значение в данном указанном диапазоне входят в объем изобретения. Верхние и нижние пределы таких меньших диапазонов, которые могут быть независимо включены в меньшие диапазоны, также входят в объем изобретения, при этом допускается любой специально исключенный предел в указанном диапазоне. В том случае, когда указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие любой один или оба таких включенных пределов, также охватываются изобретением.

Пример 1.

В настоящем примере описаны материалы и способы, используемые в примерах 2-5, описанных ниже.

ВИЧ-антитела клонировали и получали после улавливания gp140-специфичных отдельных В-клеток, как описано ранее (Mouquet, H. et al. PLoS One 6, e24078 (2011); Tiller, T. et al. J Immunol Methods 329, 112-24 (2008); and Scheid, J.F. et al. Nature 458, 636-40 (2009)). "Гликомутантные" антитела PGT121GM и 10-1074GM создавали, заменяя остатки 10-1074 в положениях HC 32, 53, 54, 58, 97, 1001 остатками PGT121 и наоборот. Связывающие свойства анти-gp140-антител по отношению к белкам оболочки Env ВИЧ анализировали в ELISA, SPR и анализах с использованием микроматриц гликанов, как описано (Scheid, J.F. et al. Science 333, 1633-7 (2011); Walker, L.M. et al. Nature 477, 466-70 (2011); and Mouquet, H. et al. PLoS One 6, e24078 (2011)). Нейтрализацию оценивали, используя (i) основанный на люциферазе анализ в клетках TZM.bl и (ii) основанный на PBMC анализ с использованием инфекции основными вариантами ВИЧ-1, как описано ранее (Li, M. et al. J Virol 79, 10108-25 (2005); Euler, Z. et al. Journal of virology 85, 7236-45 (2011); and Bunnik, E.M. et al. Nature medicine 16, 995-7 (2010)). Структуры Fab-фрагментов PGT121 ("не связанного с лигандом" и "связанного с лигандом"), 10-1074 и GL были получены способом молекулярного замещения с разрешением до 2,8 Å, 2,3 Å, 1,8 Å и 2,4 Å, соответственно.

ОТ-ПЦР на отдельных В-клетках и анализы генов Ig.

Сортировку отдельных клеток в случае В-клеток gp140+CD19+IgG+ из PBMC пациента 10 (pt10; названного пациентом 17 в публикации Nature 477(7365): 466-470), синтез кДНК и гнездовую ПЦР-амплификацию генов Ig осуществляли в предыдущем исследовании (PLoS One 6(9) :e24078). Гены Ig λ , экспрессированные клональными вариантами PGT121, амплифицировали в ПЦР, используя прямой праймер (L-V λ 3-21*02: 5' CTGGACCGTTCTCCTCCTCG 3') выше области лидера, чтобы избежать потенциально мутированной области (31). Все продукты ПЦР секвенировали и анализировали в отношении используемого гена Ig, анализа CDR3 и количества соматических гипермутаций VH/V κ (IgBLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast> и IMGT®; <http://www.imgt.org>). Множественные выравнивания последовательностей осуществляли, используя программу MacVector (v.12.5.0) с функцией анализа ClustalW (параметры по умолчанию), и использовали для создания дендрограмм способом объединения соседних пар (с использованием режима выбора наилучшего дерева и использования внешних групп для укоренения). Альтернативно дендрограммы создавали, используя способ UPGMA (с использованием режима выбора наилучшего дерева).

Участки гена-предшественника зародышевой линии (GL) PGT121-подобных и 10-1074-подобных антител идентифицировали, используя IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>) и IMGT®/V-QUEST (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/) как VH4-59*01, JH6*03, VL3-21*02 и JL3*02. (Такие участки генов относятся к наиболее часто используемым в репертуаре антител человека (PLoS One 6(8) : e22365; Immunogenetics 64(5) : 337-350). Чтобы построить репрезентативную последовательность предшественника GL, авторы выравнивали последовательности IgH и IgL 10-996 (антитела, содержащего меньше всего соматических гипермутаций) с последовательностями GL, используя IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>). Последовательность IgH GL конструировали, заменяя участки зре-

лых генов VH и JH их GL-аналогами и используя последовательность 10-996 для области CDRH 3, включающей нуклеотиды N-области и участок гена DH. Последовательность IgL GL собирали из последовательностей участков генов VL3-21*02 и JL3*02.

Клонирование и получение антител.

Очищенные расщепленные продукты ПЦР клонировали в векторах, экспрессирующих Igy1 или Iql человека (J. Immunol. Methods 329(1-2): 112-124). Затем векторы, содержащие гены IgH и Igl, секвенировали и сравнивали с исходными последовательностями продуктов ПЦР. PGT121 и 10-303 имели один и тот же ген IgA, и имели одно аминокислотное отличие в положении 2 гена IgH (фиг. 4); поэтому, чтобы получить IgG PGT121, авторы использовали ген Igl, 10-303 и ген IgH PGT121, образованный введением одной замены (V2M) в ген IgH 10-303 посредством сайт-специфичного мутагенеза (набор для сайт-специфичного мутагенеза QuikChange; Stratagene). Чтобы создать His-меченые Fab, гены VH PGT121 и 10-1074 субклонировали в векторе экспрессии 6xHis-IgCeee1, образованном в результате модификации стандартного вектора Igy1 авторов настоящего изобретения (Science 301(5638) : 1374-1377) так, чтобы кодировать домен CH1 IgG1, за которым следует метка 6x-His. Фрагменты ДНК IgH, кодирующие мутантные антитела PGT121GM (S32Y, K53D, S54R, N58T, H97R, T1001Y) и 10-1074GM (Y32S, D53K, R54S, T58N, R97H, Y1001T), получали в виде синтетического минигена (IDT) и субклонировали в Igy1-экспрессирующих векторах.

Ниже указана последовательность тяжелой цепи 10-1074GM, в которой подчеркнуты мутации. Последовательность легкой цепи 10-1074GM такая же, как в случае 10-1074.

```

QVQLQESGPGGLVKPSETLSVTCSVSGDSMNNSYWTWIRQSPGKGLEWIGYISKSESAN
YNPSLNSRVVISRDSKNQLSLKLNVPADTAVYYCATARHGQR IYGVVVSFGEFFTYYSMDVWG
KGTTVTVSS

```

Антитела и Fab-фрагменты получали с использованием временной трансфекции плазмидами, экспрессирующими IgH и IgL, экспоненциально растущих клеток HEK 293T (ATCC, CRL-11268), используя способ преципитации полиэтиленимином (PEI) (PLoS One 6(9) : e24078). IgG-антитела аффинно очищали, используя шарики из сефарозы с белком G (GE Healthcare), согласно инструкциям производителя. Fab-фрагменты аффинно очищали, используя содержащую кобальт смолу HisPur™ (Thermo scientific), как описано ниже.

Белки Env ВИЧ-1.

Вводили аланиновые мутации в вектор pYU-2 gp120 (подарок J. Sodroski, Harvard Medical School) в положения 301-303 (Asn-Asn-Thr), 324-325 (Gly-Asp) и 332 (Asn) (нумерация аминокислот HXBc2), используя набор для сайт-специфичного мутагенеза QuikChange (Stratagene) согласно инструкциям производителя. Такой же способ использовали для создания "двойных гликановых" мутантов введением одиночных аланиновых мутаций в вектор gp120N332A pYU-2 в каждый PNGS, локализованный между Asn262gp120 и Asn406gp120. Сайт-специфичные мутации подтверждали секвенированием ДНК.

Векторы экспрессии, кодирующие белки gp140 YU-2 (Journal of virology 74(12): 5716-5725), gp120 YU-2, HXBc2 gp120core (Nature 393(6686): 648-659), HXBc2 2CCcore (PLoS Pathog. 5(5): e1000445) и мутантные белки gp120 YU-2 использовали для трансфекции клеток HEK 293T. Чтобы получить белок gp120 YU-2 только с высоким содержанием маннозы (gp120kif), во время трансфекции добавляли 25 мкМ кифунензина (Enzo Life Sciences). Собирали надосадки культур и концентрировали, используя основанные на центрифугировании фильтрующие устройства (Vivacell 100, Sartorius Stedim Biotech GmbH), которые обеспечивали замену буфера в образцах на буфер, содержащий 10 мМ имидазол, 50 мМ фосфат натрия, 300 мМ хлорид натрия; pH 7,4. Белки очищали аффинной хроматографией, используя смолу, содержащую кобальт, HisPur™ (Thermo scientific) согласно инструкциям производителя.

Для реакций дегликозилирования 50 мкг gp120 YU-2, продуцированного клетками HEK 293T, в PBS расщепляли в течение ночи при 37°C, используя 200 единиц PNG-азы F (New England Biolabs) или 10000 единиц Endo-Hf (New England Biolabs) в соответствующих буферах для реакций без денатурирующих средств. После замены буфера на PBS с использованием центрифугирующих фильтровальных устройств (Amicon® Ultra, Millipore) исследовали обработанные гликозидазой gp120 (200 нг) в SDS-ПААГ, используя 4-12% гель NuPAGE (Invitrogen), с последующим окрашиванием серебром (Pierce Silver Stain Kit, Thermo Scientific).

ELISA.

96-луночные планшеты для ELISA с высокой способностью к связыванию (Costar) покрывали в течение ночи 100 нг/луночку очищенного gp120 в PBS. После промывки планшеты блокировали в течение 2 часов, используя 2% БСА, 1 мкМ EDTA, 0,05% твин-PBS (блокирующий буфер) и затем инкубировали в течение 2 часов с IgG в концентрации 26,7 нМ (или 427,2 нМ в случае ELISA с использованием двойных гликановых мутантов gp120 YU-2) и 7 последовательных разведений 1:4 в PBS. После промывки планшеты проявляли, инкубируя с антителами козы против IgG человека, конъюгированными с HRP (Jackson ImmunoResearch) (в концентрации 0,8 мкг/мл в блокирующем буфере), в течение 1 часа и добавляя хромогенный субстрат HRP (раствор ABTS, Invitrogen) (PLoS One 6(9): e24078). Связывание антител с вы-

бранными перекрывающимися пептидами gp120 V3 тестировали, используя ранее описанный способ ELISA пептидов.

Для конкурентного ELISA планшеты, покрытые gp120, блокировали в течение 2 часов блокирующим буфером и затем инкубировали в течение 2 ч с биотинилированными антителами (в концентрации 26,6 нМ в случае PGT121, 0,21 нМ в случае 10-1074, 0,43 нМ в случае 10-996 и 1,67 нМ в случае 10-1369) в растворах конкурентов антител, серийно разбавленных 1:2 в PBS (диапазон концентраций IgG составляет от 5,2 до 667 нМ). Планшеты проявляли как описано выше, используя конъюгированный с HRP стрептавидин (Jackson ImmunoResearch) (в концентрации 0,8 мкг/мл в блокирующем буфере). Все эксперименты осуществляли, по меньшей мере, в двух повторах.

Анализ на микроматрице гликанов.

Микроматрицы создавали, используя роботизированную печать гликановых зондов, связанных с липидом (неогликолипиды), на покрытых нитроцеллюлозой предметных стеклах (Methods Mol. Biol. 808: 117-136) на двух уровнях (2 и 5 фмоль/пятно) в двух повторах. Анализы связывания осуществляли с использованием микроматриц, содержащих 15 неогликолипидом, полученных из N-гликанов типа с высоким содержанием маннозы и комплексного типа. Последовательности зондов показаны на фиг. 7А. Вкратце, антитела тестировали в концентрации 50 мкг/мл и связывание выявляли, используя биотинилированные антитела против IgG человека (Vector) и затем меченый AlexaFluor 647 стрептавидин (Molecular Probes).

Резонанс поверхностного плазмона.

Эксперименты осуществляли, используя Biacore T100 (Biacore, Inc) (Nature 467(7315): 591-595). Кратко, белки gp140 и gp120 YU-2 связывали первичными аминами на чипах CM5 (Biacore, Inc.) при плотности связывания 300 единиц ответа. Анти-gp120-IgG и предшественник зародышевой линии (GL) инъецировали на проточные ячейки по 1 мкМ и 10 мкМ, соответственно, со скоростью потока 35 мкл/мин и 3 минутной фазой ассоциации и 5-минутной фазой диссоциации. Сенсорную поверхность регенерировали, используя 30-секундную инъекцию 10 мМ глицина-HCl, pH 2,5, со скоростью потока 50 мкл/мин. Константы диссоциации (k_d (сек-1)), ассоциации (k_a (M-1 сек-1) и связывания (KD (M) или KA (M-1) вычисляли на основании кинетических анализов после вычитания фона, используя модель связывания 1:1 без коррекции коэффициента отражения (RI) массы (компьютерная программа для оценки Biacore T100). Константы связывания для бивалентных IgG, вычисленные с использованием модели связывания 1:1, названы в тексте "кажущимися" аффинностями, чтобы подчеркнуть, что значения KD включают потенциальные эффекты avidности. Анализы нейтрализации

Нейтрализацию вирусов оценивали, используя основанный на люциферазе анализ в клетках TZM.bl (J. Virol. 79(16): 10108-10125). Тестируемые псевдовirusы ВИЧ-1 содержали главным образом вирусы tier-2 и tier-3 (Journal of virology 84(3) : 1439-1452) (табл. 4 и 5). Псевдовirusы только с высоким содержанием маннозы были продуцированы в клетках диконого типа, обработанных 25 мкМ кифунензина (Enzo Life Sciences) (фиг. 8С), или в клетках HEK 293S GnTI-/- (фиг. 8D). Нелинейный регрессионный анализ использовали для вычисления концентраций, при которых наблюдалось полумаксимальное ингибирование (значения IC_{50}). Нейтрализующие активности также оценивали в ранее охарактеризованном основном на РВМС анализе, используя инфекцию основными вариантами ВИЧ-1 ($n=95$), выделенными из организмов доноров, инфицированных кладой В с известными датами сероконверсии либо с 1985 по 1989 годы ("исторические сероконверторы", $n=14$), либо с 2003 по 2006 годы ("современные сероконверторы", $n=21$) (Journal of virology 5(14): 7236-7245; Nat. Med. 16(9): 995-997). Нейтрализующую активность каждого антитела вычисляли, используя компьютерную программу GraphPad (v5.0b), в виде площади под кривой наилучшей подгонки, которая соответствует доле вирусов, нейтрализованных выше значений IC_{50} в диапазоне от 0,001 до 50 мкг/мл. Значения относительной площади под кривой (RAUC) получали в результате нормализации всех значений AUC относительно наибольшего значения (полученного с использованием 10-1074).

Статистические анализы.

Статистические анализы осуществляли с использованием компьютерной программы GraphPad Prism (v5.0b). Эффективности нейтрализации в анализе TZM-bl против выбранной панели из 9 штаммов вирусов по сравнению с кажущимися аффинностями связывания антитела в случае gp120 и gp140 анализировали, используя коэффициент корреляции Спирмена. Критерий Манна-Уитни использовали для сравнения: (i) аффинностей по отношению gp120/gp140 антител, относящихся в группе PGT121 или 10-1074, и (ii) активности нейтрализации против вирусов, выделенных из организма исторических и современных сероконверторов.

Кристаллизация и определение структуры.

Экспрессировали 6x-His-меченые Fab PGT121, 10-1074 и 10-996GL для кристаллизации. Fab очищали из надосадков временно трансфицированных клеток HEK 2936E последовательно Ni^{2+} -NTA-аффинной хроматографией (Qiagen) и эксклюзионной хроматографией по размеру на Superdex200 10/300 (GE Healthcare). Кристаллы не связанного с лигандом PGT121 Fab, PGT121 IgG выделяли из надосадков временно трансфицированных клеток HEK 293-6E аффинной хроматографией на белке А (Pierce), и Fab-фрагменты получали расщеплением папаином IgG и последующей очисткой с использованием эксклю-

зионной хроматографии по размеру на Superdex200 10/300 (GE Healthcare).

Очищенные Fab концентрировали до 8-20 мг/мл ("не связанный с лигандом" PGT121, 8 мг/мл; 10-1074 и GL, 20 мг/мл) в PBS-буфере. Кристаллы "связанного с лигандом" PGT121 Fab получали из образца белка (конечная концентрация: 15 мг/мл), который смешивали с 3-кратным молярным избытком гликана NA2 и инкубировали при 20°C в течение 2 часов. Скрининг условий кристаллизации осуществляли при 20°C, используя роботизированное устройство для кристаллизации Mosquito® (TTP labs) в каплях размером 400 нл, используя соотношение белка к резервуарному раствору 1:1. Кристаллы "не связанного с лигандом" PGT121 Fab (P212121; a=56,8, b=74,7, c=114,9 Å) получали в 24% ПЭГ 4000, 0,1 М трис-HCl, pH 8,5, 10 mM CuCl₂, и кристаллы "связанного с лигандами" PGT121 Fab (P212121; a=67,8, b=67,8, c=94,1 Å) выращивали в 17% ПЭГ 10000, 0,1 М бис-трис, pH 5,5, 0,1 М CH₃COONH₄. Кристаллы 10-1074 Fab (P21; a=61,4, b=40,3, c=84,5 Å; β=95,39°) получали в 25% ПЭГ 3350, 0,1 М бис-трис, pH 5,5, 0,2 М NaCl, и кристаллы GL Fab (P21; a=54,9, b=344,7, c=55,2 Å; β=91,95°) выращивали в 20% ПЭГ 3350, 0,24 М малонате натрия, pH 7,0, 10 mM MnCl₂. Кристаллы подвергали криопротекции, замачивая в маточном растворе, содержащем 20% глицерина ("не связанный с лигандом" и "связанный с лигандом" PGT121 Fab) или 20% этиленгликоля (10-1074 Fab и GL Fab) и затем мгновенно охлаждали в жидком азоте.

Данные дифракции получали с использованием пучка синхротронного излучения 12-2 (длина волны=1,029 Å) стэндфордского синхротронного источника света (SSRL) на 6-мегапиксельном детекторе Pilatus 6M (Dectris). Данные индексировали, интегрировали и масштабировали, используя XDS. Используя данные, полученные для "не связанных с лигандом" кристаллов Fab PGT121, авторы использовали Phenix, чтобы найти решение для молекулярного замещения в случае одного Fab на ассиметричную ячейку (цепи H и L для тяжелой и легкой цепи, соответственно), используя две модели поиска, домены CH-CL Fab PGT128 (PDB код 3PV3) и домены VH-VL 2F5 (PDB коде 3IDJ) после исключения остатков в петлях CDRH 3 и CDRL 3. Затем авторы использовали "не связанную с лигандом" структуру PGT121 в качестве поисковой модели, чтобы найти решения для молекулярного замещения в случае "связанного с лигандом" Fab PGT121 (один Fab на ассиметричную ячейку), Fab 10-1074 (один Fab на ассиметричную ячейку) и GL (четыре Fab на ассиметричную ячейку).

Итерационное уточнение (включая ограничения некристаллографической симметрии для GL) осуществляли, используя Phenix и вручную подгоняя модели, с получением карты электронной плотности с использованием программы Coot. Атомные модели уточняли с разрешением до 3,0 Å в случае Fab PGT121 (Rwork=21,6%; Rfree=26,4%), с разрешением 1,9 Å в случае Fab 10-1074 (Rwork=18,7%; Rfree=22,3%), с разрешением 2,4 Å в случае четырех молекул Fab GL (Rwork=19,4%; Rfree=23,7%) и с разрешением 2,4 Å в случае "связанного с лигандом" Fab PGT121 (Rwork=20,1%; Rfree=24,9%). Атомная модель Fab PGT121 содержит 95,2%, 4,9% и 0,0% остатков в предпочтительных, разрешенных и запрещенных областях карты Рамачандрана, соответственно (Fab 10-1074: 98,8%, 0,9%, 0,2%; Fab GL: 96,0%, 3,8%, 0,23%; "связанный с лигандом" Fab PGT121: 96,7%, 3,1%, 0,2%). PyMOL использовали для молекулярной визуализации и для создания фигур, изображающих структуры Fab. Вычисления площади скрытой поверхности осуществляли, используя Apeaimol (пакет программ CCP4) и зонд 1,4 Å.

Структуры Fab выравнивали, используя Super script в PyMOL. Парные выравнивания Ca осуществляли, используя PDBeFold.

Пример 2. Преобладание и разнообразие клонотипа PGT121.

В-клетки памяти для gp140-специфичного IgG выделяли из организма донора африканца, инфицированного вирусом клды А, используя тримеры gp140 YU-2 в качестве "приманки". Идентифицировали восемьдесят семь совпадающих генов тяжелой (IgH) и легкой (IgL) цепей иммуноглобулина, соответствующих 23 уникальным семействам клонов. В репертуаре IgH против gp140 преобладало одно клональное семейство, составляющее ~28% всех размноженных клонов В-клеток. Такое семейство В-клеток соответствовало тому же клону, что и PGT121-123 (Nature 477(7365): 466-470) и содержало 38 представителей, 29 из которых были уникальными вариантами на нуклеотидном уровне (табл. 3). На основании нуклеотидной последовательности IgH семейство PGT121 делится на две группы: PGT121-подобную группу, содержащую PGT121-123 и 9 близкородственных вариантов, и вторую группу, 10-1074-подобную, содержащую 20 представителей. Хотя традиционные праймеры, созданные авторами изобретения (J. Immunol. Methods 329(1-2):112-124; Science 301(5638):1374-1377), не амплифицировали гены IgL, экспрессируемые клонами В-клеток PGT121, вследствие делеций нуклеотидов в области, кодирующей каркасную область 1, 24 из 38 генов Igλ, получали, используя новые Iqλ-специфичные праймеры, созданные для амплификации сильно соматически мутированных генов (табл. 3). В соответствии с высокими уровнями гипермутирования в генах IgH (в среднем 18,2% генов VH) амплифицированные гены Igλ, имели высокий уровень мутаций (в среднем 18,2% гена VL) и несли делеций нуклеотидов в каркасной области 1 (FWR1) (12-21 нуклеотид) и инсерцию длиной 9 нуклеотидов в каркасной области 3 (FWR3) (фиг. 3B и табл. 3).

Выравнивания последовательностей трех PGT-антител (PGT-121, -122 и -123), одиннадцати клональных вариантов PGT121 и 10-1074 (10-259, 10-303, 10-410, 10-847, 10-996, 10-1074, 10-1121, 10-1130,

10-1146, 10-1341, 10-1369 и 10-1074GM), вероятных последовательностей зародышевой линии (GL) и консенсусных последовательностей показаны на фиг. 3(a) и 3 (b). Последовательности соответствующих варибельных областей тяжелой цепи, варибельных областей легкой цепи, CDR тяжелой цепи и CDR легкой цепи согласно системам IMGT и KABT указаны в табл. 1 ниже. Присвоенные идентификационные номера последовательностей в случае последовательностей согласно системам KABT указаны в табл. 2 ниже:

Таблица 1

Последовательности IgH.

| IMGT | FWR1 | CDR1 | FWR2 | CDR2 | FWR3 | CDR3 | FWR4 |
|-----------|-------------------------------|----------|--------------------|------------------|---|---------------------------|--------------|
| 10-1369 | QVQLQESGPGGLVLPKLETLSSLTCNVS | GAFLADHY | WSWIRLPLGKGFPEWIGY | VEDRGGDI | NYNPSLKNRVHLSLDKSTNQVSLKLMAVTAGDSALYYC | ATTKHGRRYGVVAFGEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-259 | QVHLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCNVS | GTLVRDNY | WSWMHQPLGKGFPEWIGY | VEDSGDT | NYNPSLKRSHVHLSLDKSNLNLVSLRLAVTAADSATYYC | ATTKHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-303 | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCNVS | GASISDSY | WSWIRKSPGKGLLEWIGY | VEKSGDT | NYSPSLKSRVHLSLDTSKNQVSLSLVAATAADSGRYC | ARTLHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGNQGVTVIVSS |
| 10-410 | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCNVS | GASVNDAY | WSWIRQSPGKRFPEWVGY | VEHSGDT | NYNPSLKRRTVPSLDTARNEVSLKLVATAADSAVYFC | ARALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-1130 | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCNVS | GASINDAY | WSWIRQSPGKRFPEWVGY | VEHSGDT | NYNPSLKRRTVPSLDTARNEVSLKLVATAADSAVYFC | ARALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-1121 | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCNVS | GASINDAY | WSWIRQSPGKRFPEWVGY | VEHSGDT | NYNPSLKRRTVPSLDTARNEVSLKLVATAADSAVYFC | ARALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-1146 | QVQLVDSGPGGLVLPKSETLSSLTCTVSN | NGGVSGRP | WSWIRQSPGKGLLEWIGY | FSDTDRS | EYQPSLRRLTSLDASRNQLSLKLVATAADSAVYFC | ARALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-996 | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCNVS | NGSVSGRP | WSWIRQSPGKGLLEWIGY | FSDTEKS | NYNPSLRRLTSLDASRNQLSLKLVATAADSAVYFC | ARALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| GL | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCTVSN | GGSSISSY | WSWIRQSPGKGLLEWIGY | IYYSGST | NYNPSLKRRTVPSLDTARNEVSLKLVATAADSAVYFC | ARALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-1341 | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCTVSN | GDSMNNY | WTWIRQSPGKGLLEWIGY | ISDRESA | TYNPSLKRRTVPSLDTARNEVSLKLVATAADSAVYFC | ARALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-847 | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCTVSN | GDSMNNY | WTWIRQSPGKGLLEWIGY | ISDRASA | TYNPSLKRRTVPSLDTARNEVSLKLVATAADSAVYFC | ARALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-1074 | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCTVSN | GDSMNNY | WTWIRQSPGKGLLEWIGY | ISDRESA | TYNPSLKRRTVPSLDTARNEVSLKLVATAADSAVYFC | ARALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-1074GM | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCTVSN | GDSMNNY | WTWIRQSPGKGLLEWIGY | TSKRSRA | NYNPSLKRRTVPSLDTARNEVSLKLVATAADSAVYFC | ARALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| KABAT | FWR1 | CDR1 | FWR2 | CDR2 | FWR3 | CDR3 | FWR4 |
| 10-1369 | QVQLQESGPGGLVLPKLETLSSLTCNVS | DHYWS | WIRLPLGKGFPEWIG | YVHDSGDINYNPSLKN | RVHLSLDKSTNQVSLKLMVAVTAGD | TKHGRRYGVVAFGEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-259 | QVHLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCNVS | DNYWS | WMRQPLGKGFPEWIG | YVHDSGDINYNPSLKS | RVHLSLDKSNLNLVSLRLAVTAAD | TKHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-303 | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCNVS | DSYWS | WIRKSPGKGFPEWIG | YVHDSGDINYNPSLKS | RVNLSLDTSKNQVSLSLVAATAAD | TLHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGNQGVTVIVSS |
| 10-410 | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCNVS | DAYWS | WIRQSPGKGFPEWIG | YVHDSGDINYNPSLKN | RVTFSLDTAKNEVSLKLVATAAD | ALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-1130 | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCNVS | DAYWS | WIRQSPGKGFPEWIG | YVHDSGDINYNPSLKN | RVTFSLDTAKNEVSLKLVATAAD | ALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-1121 | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCNVS | DAYWS | WIRQSPGKGFPEWIG | YVHDSGDINYNPSLKN | RVTFSLDTAKNEVSLKLVATAAD | ALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-1146 | QVQLVDSGPGGLVLPKSETLSSLTCTVSN | GRFWS | WIRQSPGKGFPEWIG | YFSDTDRSEYNPSLKS | RVTLSDASRNQLSLKLVATAAD | ARALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-996 | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCNVS | GRFWS | WIRQSPGKGFPEWIG | YFSDTEKSNPSLKS | RVTLSDASRNQLSLKLVATAAD | ARALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| GL | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCTVSN | SYWS | WIRQSPGKGFPEWIG | YIYSGSTNYNPSLKN | RVTFSLDTAKNEVSLKLVATAAD | ALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-1341 | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCTVSN | NYWT | WIRQSPGKGFPEWIG | YISDRESATYNPSLKN | RVVTSRDTSTNQVSLKLVATAAD | ARALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-847 | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCTVSN | NYWT | WIRQSPGKGFPEWIG | YISDRESATYNPSLKN | RVVTSRDTSTNQVSLKLVATAAD | ARALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-1074 | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCTVSN | NYWT | WIRQSPGKGFPEWIG | YISDRESATYNPSLKN | RVVTSRDTSTNQVSLKLVATAAD | ARALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |
| 10-1074GM | QVQLQESGPGGLVLPKSETLSSLTCTVSN | NSYWT | WIRQSPGKGFPEWIG | YISKESANYNPSLKN | RVVTSRDTSTNQVSLKLVATAAD | ARALHGRRYGVIVAFNEWFTYFYMV | WGRGTTVTIVSS |

Последовательности IgL.

| IMGT | FWR1 | CDR1 | FWR2 | CDR2 | FWR3 | CDR3 | FWR4 |
|---------|---------------------------|-------------|-------------------|---------|--|------------|------------|
| GL | SYVLIQPPFVSVVAPGQTARITCGN | NIGSKS | VHWYQKPGQAPVIVVY | DDSDRPS | GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDFADYYC | QVWDSGSHFW | FGGGTKLTVL |
| 10-1369 | SSMSVPGETAKITCGEK | SIGSRA | VQWYQKPGQAPSLIIY | NNQDRPS | GVPERFSGADIEFGTTATLTINVEAGDEADYYC | HIYDARRPTN | FDRGTTLTVL |
| 10-259 | SSMSVPGETAKITCGEK | SIGSRA | VQWYQKPGQAPSLIIY | NNQDRPS | GVPERFSGADIEFGTTATLTINVEAGDEADYYC | HIYDARRPTN | FDRGTTLTVL |
| 10-303 | SDISVAPGETAKITCGEK | SLGSRA | VQWYQHRGQAPSLIIY | NNQDRPS | GIPERFSGPDSFGTTATLTINVEAGDEADYYC | HIWDSRRPTK | FGGGTKLTVL |
| 10-1121 | SFVSVAPGQTARITCGEE | SLGSRS | VIVYQKPGQAPSLIIY | NNHDRPS | GIPERFSGPDSFGTTATLTINVEAGDEADYYC | HIWDSRRPTN | FGEPTLTVL |
| 10-410 | SFVSVAPGQTARITCGEE | SLGSRS | VIVYQKPGQAPSLIIY | NNHDRPS | GIPERFSGPDSFGTTATLTINVEAGDEADYYC | HIWDSRRPTN | FGEPTLTVL |
| 10-1130 | SFVSVAPGQTARITCGEE | SLGSRS | VIVYQKPGQAPSLIIY | NNHDRPS | GIPERFSGPDSFGTTATLTINVEAGDEADYYC | HIWDSRRPTN | FGEPTLTVL |
| 10-847 | SYVRELSVALGETASISGGRQ | ALGSRA | VQWYQHRGQAPFILLIY | NNQDRPS | GIPERFSGPDPINFGTRATLTISVEAGDEADYYC | HMWDSRSGFS | FGGATRLTVL |
| 10-1074 | SYVRELSVALGETASISGGRQ | ALGSRA | VQWYQHRGQAPFILLIY | NNQDRPS | GIPERFSGPDPINFGTRATLTISVEAGDEADYYC | HMWDSRSGFS | FGGATRLTVL |
| 10-1341 | SYVRFPSVATGRTARITCGGRQ | ALGSRA | VQWYQHRGQAPFILLIY | NNQDRPS | GIPERFSGPDPINFGTRATLTISVEAGDEADYYC | HMWDSRSGFS | FGGATRLTVL |
| 10-996 | SSLPLSVAPGATAKIAICGEEK | SFASRA | VQWYQKPGQAPVLIY | NNQDRPS | DRPAGVSRERFSGPDMVFGSTATLTISVEAGDEADYYC | HKWDSRSPIS | FGGGTQLTVL |
| 10-1146 | SSLPLSVAPGATAKIAICGEEK | SFASRA | VQWYQKPGQAPVLIY | NNQDRPS | DRPAGVSRERFSGPDMVFGSTATLTISVEAGDEADYYC | HKWDSRSPIS | FGGGTQLTVL |
| KABAT | FWR1 | CDR1 | FWR2 | CDR2 | FWR3 | CDR3 | FWR4 |
| GL | SYVLIQPPFVSVVAPGQTARITCGN | GGNIGSKSVH | VYQKPGQAPVIVVY | DDSDRPS | GIPERFSGNSGNTATLTISRVEAGDFADYYC | QVWDSGSHFW | FGGGTKLTVL |
| 10-1369 | SSMSVPGETAKITCGEK | GEKSIGSRAVQ | VYQKPGQAPVLIY | NNQDRPS | GVPERFSGADIEFGTTATLTINVEAGDFADYYC | HIYDARRPTN | FDRGTTLTVL |
| 10-259 | SSMSVPGETAKITCGEK | GEKSIGSRAVQ | VYQKPGQAPVLIY | NNQDRPS | GVPERFSGADIEFGTTATLTINVEAGDFADYYC | HIYDARRPTN | FDRGTTLTVL |
| 10-303 | SDISVAPGETAKITCGEK | GEKSIGSRAVQ | VYQHRGQAPVLIY | NNQDRPS | GIPERFSGPDSFGTTATLTINVEAGDFADYYC | HIWDSRRPTK | FGGGTKLTVL |

| | | | | | | | |
|---------|--------------------|-------------|----------------------|---------|---|--------------|------------|
| 10-1121 | SFVSVAPGQTARITC | GEESLGRSVI | WYQQRPGQAPS LLIMY | NNDRPS | GI PER FSGSFGSTFGTTATLITISVE AGDEADYYC | HIWDSRRPTNWX | FGEQTTLTVL |
| 10-410 | SFVSVAPGQTARITC | GEESLGRSVI | WYQQRPGQAPS LLIY | NNDRPS | GI PER FSGSFGSTFGTTATLITISVE AGDEADYYC | HIWDSRRPTNWX | FGEQTTLTVL |
| 10-1130 | SFVSVAPGQTARITC | GEESLGRSVI | WYQQRPGQAPS LLIY | NNDRPS | GI PER FSGSFGSTFGTTATLITISVE AGDEADYYC | HIWDSRRPTNWX | FGEQTTLTVL |
| 10-847 | SYVRPLSVALGETARISC | GRQALGSRVQ | WYQHRPGQAPI LLIY | NNQDRPS | GI PER FSGTDFINFGTRATLITISVE AGDEADYYC | HMWDSRSGFSWS | FGGATRLTVL |
| 10-1074 | SYVRPLSVALGETARISC | GRQALGSRVQ | WYQHRPGQAPI LLIY | NNQDRPS | GI PER FSGTDFINFGTRATLITISVE AGDEADYYC | HMWDSRSGFSWS | FGGATRLTVL |
| 10-1341 | SYVRPLSVALGETARISC | GRQALGSRVQ | WYQHRPGQAPI LLIY | NNQDRPS | GI PER FSGTDFINFGTRATLITISVE AGDEADYYC | HMWDSRSGFSWS | FGGATRLTVL |
| 10-996 | SSLPLSVAPGATAKIIAC | GEKSFASRAVQ | WYQQRPGQAPV LLIY | NNQDRPA | GVSRFSGTDFWFGSTATLITISRVE AGDEADYYC | HKWDSRSPISVW | FGGGTQLTVL |
| 10-1146 | SSLPLSLAPGATAKIPC | GEKSRGSRVQ | WYQQRPGQAPT LLIY | NNQDRPA | GVSRYSGNFDVAIGVTATLITISRVE AGDEAEYYC | HYWDSRSPISVW | FGGWTQLTVL |

Таблица 2

| Название | SEQ ID NO | | | |
|--------------|---------------------|-----------------|---------------------|---------------------|
| | Варибельная область | | CDR 1-3 | |
| | Тяжелая цепь (H) | Легкая цепь (L) | H | L |
| консенсусная | SEQ ID NO: 1 | SEQ ID NO: 2 | SEQ ID NO : 33-35 | SEQ ID NO : 36-38 |
| 10-259 | SEQ ID NO: 3 | SEQ ID NO: 4 | SEQ ID NO : 39-41 | SEQ ID NO : 42-44 |
| 10-303 | SEQ ID NO: 5 | SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO : 45-47 | SEQ ID NO : 48-50 |
| 10-410 | SEQ ID NO: 7 | SEQ ID NO: 8 | SEQ ID NO : 51-53 | SEQ ID NO : 54-56 |
| 10-847 | SEQ ID NO: 9 | SEQ ID NO: 10 | SEQ ID NO : 57-59 | SEQ ID NO : 60-62 |
| 10-996 | SEQ ID NO: 11 | SEQ ID NO: 12 | SEQ ID NO : 63-65 | SEQ ID NO : 66-68 |
| 10-1074 | SEQ ID NO: 13 | SEQ ID NO: 14 | SEQ ID NO : 69-71 | SEQ ID NOs: 72-74 |
| 10-1121 | SEQ ID NO: 15 | SEQ ID NO: 16 | SEQ ID NO : 75-77 | SEQ ID NO : 78-80 |
| 10-1130 | SEQ ID NO: 17 | SEQ ID NO: 18 | SEQ ID NO : 81-83 | SEQ ID NO : 84-86 |
| 10-1146 | SEQ ID NO: 19 | SEQ ID NO: 20 | SEQ ID NO : 87-89 | SEQ ID NO : 90-92 |
| 10-1341 | SEQ ID NO: 21 | SEQ ID NO: 22 | SEQ ID NO : 93-95 | SEQ ID NO : 96-98 |
| 10-1369 | SEQ ID NO: 23 | SEQ ID NO: 24 | SEQ ID NO : 99-101 | SEQ ID NO : 102-104 |
| PGT-121 | SEQ ID NO: 25 | SEQ ID NO: 26 | SEQ ID NO : 105-107 | SEQ ID NO : 108-110 |
| PGT-122 | SEQ ID NO: 27 | SEQ ID NO: 28 | SEQ ID NO : 111-113 | SEQ ID NO : 114-116 |
| PGT-123 | SEQ ID NO: 29 | SEQ ID NO: 30 | SEQ ID NO : 117-119 | SEQ ID NO : 120-122 |
| GL | SEQ ID NO: 31 | SEQ ID NO: 32 | SEQ ID NO : 123-125 | SEQ ID NO : 126-128 |
| 10-1074GM | SEQ ID NO: 129 | SEQ ID NO: 130 | SEQ ID NO : 131-133 | SEQ ID NO : 134-136 |

Экспрессировали одиннадцать новых уникальных вариантов (табл. 3) и показали связывание с gp120 и gp140 YU-2 с использованием ELISA и резонанса поверхностного плазмона (SPR). Если не указано иное, белки gp120 и gp140 для таких и других экспериментов экспрессировали в клетках млекопитающих, которые могут связывать N-гликан либо комплексного типа, либо типа с высоким содержанием маннозы с PNGS. Уровни реактивности по отношению к gp120 отличаются в случае антител, относящихся к группам PGT121 и 10-1074, последняя группа имеет более высокие кажущиеся аффинности (фиг. 3А), главным образом, вследствие более медленной диссоциации из комплекса с gp120/gp140 в случае 10-1074-родственных антител (фиг. 4В).

Пример 3. Эпитопы PGT121 и 10-1074.

Сообщалось, что Asn332gp120 вблизи ствола петли V3 важен для связывания и нейтрализации вирусов под действием PGT121 (Nature 477(7365): 466-470), поэтому авторы исследовали роль V3 в распознавании антигена P6T121-подобными и 10-1074-подобными антителами. ELISA осуществляли, используя белки "кора" gp120 HXB2, в которых отсутствуют петли V1-V3 (gp120core) или сохраняется часть V3 (2CC-core), и используя мутантный белок gp120 YU-2, несущий двойную аланиновую замену в стволе V3 (gp120GD324-5AA). Тестируемые антитела проявляли пониженную реактивность против вариантов, в которых отсутствовала петля V3, и gp120GD324-5AA по сравнению с интактным gp120 YU-2, при этом наибольшему влиянию подвергалось связывание антител группы 10-1074 (фиг. 5А и В). Полученные результаты свидетельствуют, что в распознавание обеими группами антител вовлечены детерминанты белка вблизи петли V3. Ни одно из антител не связывалось с перекрывающимися пептидами, охватывающими V3, что свидетельствует о том, что целевые эпитопы являются прерывистыми и/или требуют особой конформации, которая не достигается в случае выделенных пептидов (фиг. 5С).

Asn332gp120 (Asn337gp120 в более ранней нумерации (J. Proteome Res 7(4): 1660-1674)) является N-концевым остатком потенциального сайта N-гликозилирования (PNGS), определяемого как последовательность Asn-X-Ser/Thr. Чтобы определить, требуется ли Asn332gp120 и/или N-связанный с ним гликан для реактивности по отношению к gp120 новых антител PGT121- и 10-1074-групп, авторы тестировали их связывание с gp120N332A YU-2 в ELISA. Замена N332A снижала связывание PGT121 и всех новых вариантов антител, тогда как их реактивность, направленная против мутантного gp120, в котором отсутствует соседний сайт гликозилирования (мутант gp120NNT301-3AAA), не изменялась. Чтобы определить, влияет ли PNGS в дополнение к Asn332gp120 PNGS на распознавание новыми антителами, авторы конструировали серию из 11 двойных гликановых мутантов, в которых мутацию N332A в gp120 YU-2 объединяли с мутацией PNGS, расположенных между Asn262gp120 и Asn406gp120. Все PGT121-подобные и 10-1074-подобные антитела связывались с каждым из двойных гликановых мутантов со сравнимой аффинностью, как в случае gp120N332A.

Чтобы сравнить общее распознавание гликанов PGT121- и 10-1074-подобными антителами, авторы исследовали их связывание с gp120 YU-2, обработанным с PNG-азой F, которая расщепляет N-гликаны как комплексного типа, так и N-гликаны с высоким содержанием маннозы. Поскольку gp120 не может быть полностью ферментативно дегликозилирован, если только он не денатурирован, то обработка PNG-азой F приводила к частичному дегликозилированию gp120 с нативной укладкой (фиг. 6). Тем не менее, реактивности двух групп антител отличались тем, что частичное дегликозилирование gp120 под действием PNG-азы F снижало активность связывания всех PGT121-подобных антител, но не снижало активность ни одного из 10-1074-подобных антител (фиг. 6C). Сходные эксперименты, проведенные с использованием gp120 YU-2, обработанного Endo H, которая расщепляет N-гликаны с высоким содержанием маннозы, но не расщепляет N-гликаны комплексного типа, выявили большее влияние на связывание 10-1074-подобных антител, чем PGT121-подобных антител (фиг. 6D).

Микроматрица N-гликанов показала, что шесть из семи тестируемых PGT121-подобных антител демонстрировали регистрируемое связывание с одно- или двуххитенными N-гликанами комплексного типа, заканчивающимися галактозой или α 2-6-связанной сиаловой кислотой, но не проявляли регистрируемого связывания с гликанами типа с высоким содержанием маннозы, подтверждая и расширяя предыдущие сообщения об отсутствии связывания PGT121-123 с N-гликанами с высоким содержанием маннозы и отсутствии конкуренции с Man4- и Man9-дендронами за связывание с gp120 (фиг. 7). Напротив, не существует регистрируемого связывания 10-1074-подобных антител с гликанами, свободными от белков (фиг. 7). Хотя PGT121-подобные антитела связывались со свободными от белков N-гликанами комплексного типа, но не связывались с N-гликанами с высоким содержанием маннозы, PGT121-подобные антитела сохраняли способность связываться с gp120 YU-2, продуцируемым в клетках, обработанных кифунензином (gp120kif), ингибитором маннозидазы, который приводит к исключительному связыванию гликанов с высоким содержанием маннозы с PNGS (фиг. 8B). В случае большинства PGT121-подобных антител наблюдали небольшое, но воспроизводимое снижение связывания с gp120kif. Напротив, 10-1074-подобные антитела полностью сохраняли связывание с gp120kif (фиг. 8B). Полученные результаты согласуются с гипотезой о том, что N-гликаны с высоким содержанием маннозы, а также N-гликаны комплексного типа могут быть вовлечены в образование эпитопа для PGT121-подобных антител.

Эксперименты по картированию эпитопов осуществляли, используя два типичных представителя каждой группы (PGT121 и 10-1369 для PGT121-подобной группы; 10-1074 и 10-996 для 10-1074-подобной группы), в конкурентном ELISA. Все четыре антитела проявляли перекрестную конкуренцию, но PGT121 слабее ингибировало связывание 10-996 и 10-1074 с gp120, чем наоборот. Чтобы дополнительно картировать целевые эпитопы, авторы использовали анти-gp120-антитела, которые распознают "корону" петли V3 (фиг. 5), CD4bs, сайт связывания корцептора (CD4-индуцируемый; CD4i), совокупность N-гликанов с высоким содержанием маннозы (2G12) (Journal of virology 76(14): 7293-7305; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(38): 13372-13377) или V3-петлю и N-связанные гликаны в положениях 301 и 332 (PGT128). Антитела против короны V3 ингибировали связывание PGT121 и 10-1369, но не мешали связыванию 10-996 и 10-1074. Антитела PGT128 и в меньшей степени 2G12, но не антитела CD4bs и CD4i, снижали связывание всех четырех антител с gp120.

Вместе взятые полученные данные свидетельствуют, что представители клона PGT121 распознают участок, в который вовлечена белковая детерминанта вблизи петли V3 и ассоциированный с Asn332gp120 гликан. Однако клон делится на два семейства, PGT121-подобные и 10-1074-подобные группы, которые отличаются своими аффинностями по отношению к gp120 и ролью гликанов в образовании эпитопов.

Пример 4. Широкая и эффективная нейтрализация ВИЧ.

Чтобы оценить нейтрализующую активность новых вариантов PGT121, авторы измеряли их способность ингибировать ВИЧ-инфекцию клеток TZM-b1, используя 10 вирусных штаммов, включая R1166.cl, в котором отсутствует PNGS в положении 332 gp120. Все варианты PGT121, включая 10-1074-подобные антитела, нейтрализовали 9 псевдовирuses и ни одно не нейтрализовало контроль R1166.cl (фиг. 1A и табл. 4). Нейтрализующая активность коррелировала с аффинностью для шипа ВИЧ, при этом в случае группы 10-1074 наблюдали немного более высокие эффективности, чем в случае группы PGT121 (фиг. 1B и фиг. 4C). Типичный вариант зародышевой линии (GL) клонотипа антитела PGT121/10-1074 не мог связывать gp120/gp140 или нейтрализовать любые вирусы, входящие в панель, что означает, что соматическая мутация необходима для связывания и нейтрализации. Спаривание легких цепей GL с тяжелыми цепями мутантной 10-1074- или 10-996-группы не могло спасти связывание или нейтрализацию, что свидетельствует о том, что обе мутантные цепи вносят вклад в правильную сборку паратопа антитела.

Следующие анализы осуществляли для того, чтобы сравнить нейтрализующие активности PGT121 и двух 10-1074-подобных антител (10-996 и 10-1074) против расширенной панели из 119 трудно нейтрализуемых псевдовирuses (классифицируемых как tier-2 и tier-3) (табл. 4 и 5). 10-996 и 10-1074 имели эффективности и широту нейтрализации, сходные с PGT121 (фиг. 1C, фиг. 9 и табл. 5 и 6). Как и предполагали, большинство вирусных, несущих аминокислотные изменения в gp120 в положениях 332 и/или 334 (охватывающих PNGS Asn332-X-Ser334/Thr334), были резистентными к нейтрализации (83,8% были ре-

зистентными к PGT121, 100% были резистентными к 10-1074 и 10-996). Мутация в таком PNGS была причиной резистентности большинства вирусов к нейтрализации (68,5% в случае 10-996, 72,5% в случае 10-1074 и 60,8% в случае PGT121) (табл. 7). Сравнимые активности нейтрализации наблюдали для IgG- и Fab-форм PGT121 и 10-1074, что свидетельствует о том, что бивалентность не является критичной для их активности (фиг. 1D).

Чтобы оценить возможную роль N-гликанов комплексного типа на оболочке ВИЧ в нейтрализации антителами PGT121 и 10-1074, авторы получали вирионы только с высоким содержанием маннозы двумя разными путями: сборкой псевдовирюсов в клетках, обработанных кифунозидом, который приводит к образованию N-связанных гликанов Man9GlcNAc2, или сборкой в клетках НЕК 293S GnTI^{-/-}, которая приводит к образованию N-связанных гликанов Man5GlcNAc2. Авторы обнаружили, что PGT121 нейтрализовало 2 из 3 полученных с кифунозидом PGT121-чувствительных/10-1074-резистентных штаммов, эквивалентно их аналогам, полученным в клетках дикого типа (фиг. 8C). Два PGT121-чувствительных/10-1074-чувствительных вирусных штамма, полученных в клетках GnTI^{-/-}, были в равной мере чувствительны к PGT121 и 10-1074, как и их аналоги, полученные в клетках дикого типа. В соответствии с ранее сообщенными данными о том, что N-гликаны комплексного типа частично защищают участок связывания CD4 от связывания антителом, вирусы, полученные в клетках GnTI^{-/-}, были более чувствительными к антителам к участку связывания CD4 (NIH45-46G54W и 3BNC60) (фиг. 8D).

Пример 5. Вновь передаваемый ВИЧ-1.

Затем авторы исследовали активность PGT121 и 10-1074 против передаваемых вирусом-основоположников, оценивая нейтрализацию в анализе на основе мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) с использованием 95 вирусов клады В, выделенных из когорты людей, у которых происходила сероконверсия с 1985 по 1989 годы (исторические сероконверторы, n=14) или с 2003 по 2006 годы (современные сероконверторы, n=25) (51, 52). Авторы сравнивали PGT121 и 10-1074 с анти-CD4bs-bN-AT и другими bN-At, включая VRC01, PG9/PG16, b12, 2G12, 4E10 и 2F5. Кластерный анализ нейтрализующей активности показал сегрегацию на две группы; PGT121/10-1074-группа содержала наиболее активные нейтрализаторы ВИЧ, включая анти-CD4bs и PG9-антитела (табл. 8). Примечательно, что в случае 10-1074 наблюдали исключительную эффективность нейтрализации на такой панели вирусов клады В, при этом наибольшую широту наблюдали при 0,1 мкг/мл (67% из 95 вирусов клады В) всех тестированных bN-At (табл. 8). Хотя 10-1074 проявляло наибольшую эффективность по отношению к современным вирусам клады В, чем PGT121 (~20-кратное различие), оба антитела были более эффективными против исторических, чем современных вирусов (фиг. 1E и фиг. 10).

Пример 6. Кристаллические структуры PGT121, 10-1074 и GL.

Чтобы исследовать структурные детерминанты различий между PGT121-подобными и 1074-подобными антителами, авторы определяли кристаллические структуры Fab-фрагментов PGT121, 10-1074 и типичного предшественника зародышевой линии (GL) с разрешением 3,0 Å, 1,9 Å и 2,4 Å, соответственно (табл. 9). Наложение переменных доменов тяжелой и легкой цепи (VH и VL) для трех Fab показало консервативность структуры остова, при этом различия ограничены небольшими перестановками петель CDRH 3 и CDRL 3 в Fab с озоревшей аффинностью по сравнению с GL (табл. 10).

Необычным признаком антител является их длинная (25 остатков) петля CDRH 3, которая образует двунитевый антипараллельный β-слой, охватывающий F- и G-нити домена VH. В каждом Fab верхушка продленной петли CDRH 3, главным образом, содержит неполярные остатки. Сходный структурный признак наблюдали в случае CDRH 3 PGT145, чувствительного к углеводам антитела, эпитоп которого включает петлю V1V2 gp120. Однако удлиненный двунитевой β-слой CDRH 3 PGT145 в основном содержит отрицательно заряженные остатки, включая два сульфатированных тирозина на верхушке. Выравнивание VH-VL PGT121 и PGT145 (табл. 10) показывает, что CDRH 3 PGT145 простирается за пределы CDRH 3 PGT121, и что его верхушка и домены VH выравниваются, тогда как CDRH 3 PGT121, 10-1074 и GL наклоняется к VL. Наклон CDRH 3 PGT121/CDRH 3 10-1074/CDRH 3 GL к VL открывает щель между CDRH2 и CDRH 3, признак, которого нет у родственных антител.

PGT121 и 10-1074 являются высоко дивергентными по отношению к GL и друг другу (из 132 остатков PGT121VH отличаются от 10-1074VH и GLVH 36 и 45 остатков, соответственно, и 10-1074VH и GLVH отличаются по 29 остаткам). Большинство различий PGT121/10-1074 локализованы в петлях CDRVH и CDRL 3. Интересно, что шесть замен в CDRH 3 (остатки 100d, 100f, 100h, 100j, 100i, 100n) чередуются так, что заменен каждый второй остаток, что вызывает изменение поверхности с образованием щели между CDRH2 и CDRH 3, которая возникает в результате наклона CDRH 3 по направлению к VL. Такая область вероятно вносит вклад в различные тонкие специфичности PGT121 и 10-1074. Пять других подвергаемых воздействию растворителя замен в каркасной области 3 тяжелой цепи (FWR3HC) (остатки 64, 78, 80-82; нити D и E) являются возможными участками контакта с антигеном, учитывая, что каркасные области в ВИЧ-антителах могут контактировать с gp120. Другие различия, которые могут вносить вклад в тонкие различия в специфичности, включают отрицательный участок на PGT121 вблизи Asp56HC, который отсутствует в 10-1074 или GL (Ser56HC в 10-1074 и GL) и положительные участки на поверхности CDRL 1 и CDRL 3, не найденные на аналогичной поверхности GL.

Соматические мутации, общие для PGT121 и 10-1074, могут быть вовлечены в общие признаки их эпитопов. Тяжелые цепи PGT121 и 10-1074 имеют только три общих мутации (из 36 различий в PGT121-GL и 29 различий в 10-1074-GL). Напротив, PGT121 и 10-1074 имеют 18 общих мутаций легких цепей (из 37 различий PGT121-GL и 36 различий 10-1074-GL), включая инсерцию в FWR3 легкой цепи, которая вызывает образование петли, соединяющей нити D и E, и замену Asp50LC-Asp51LC в CDRL 2GL на Asn50LC-Asn51LC в обоих антителах PGT121 и 10-1074, что приводит к менее отрицательно заряженной поверхности. Большое количество общих замен, введенных в LCPGT121 и LC10-1074 (примерно 50% замен LC), указывает, что CDRL 1, CDRL 2 и FWR2LC являются потенциальными областями контакта для эпитопов, общих для PGT121 и 10-1074.

Затем осуществляли сравнения со структурой PGT128, которая распознает Asn332gp120- и Asn301gp120-связанные гликаны и V3 и была определена в виде комплекса с gp120 с наружным доменом/минипетлей V3, экспрессированным в клетках, которые не могут продуцировать белки, модифицированные N-гликанами комплексного типа. В отличие от петель CDRH 3 PGT121 и 10-1074, PGT128CDRH 3 не наклоняется в сторону PGT128VL, и CDRH 3PGT128 не имеет двунитевого β -слоя. Кроме того, CDRH 3PGT128 (18 остатков) короче, чем CDRH 3 PGT121 и 10-1074 (24 остатка), тогда как CDRH2PGT128 содержит инсерцию шести остатков, не встречающуюся в PGT121 или 10-1074. Вследствие таких различий CDRH2 является наиболее выраженным признаком PGT128, тогда как CDRH 3 является наиболее выраженным в PGT121 и 10-1074. CDRH2PGT128 и CDRL 3PGT128 вместе распознают Man8/9, связанный с Asn332gp120, и CDRH 3PGT128 контактирует с основанием петли V3. Такой способ распознавания gp120 не возможен в случае PGT121 и 10-1074, так как структурные характеристики их петель CDRH2 и CDRH 3 значительно отличаются от характеристик PGT128, что согласуется со способностью PGT128, но не PGT121 и 10-1074 (фиг. 7) распознавать свободные от белков гликаны с высоким содержанием маннозы.

Пример 7. Кристаллическая структура комплекса PGT121-гликан.

Получали структуру с разрешением 2,4 Å антитела PGT121, ассоциированного с сиалилированным двухантенным гликаном комплексного типа (табл. 9), используя кристаллы, полученные в условиях, включающих присутствие NA2, несиалилированного двухантенного гликана комплексного типа (фиг. 7). Неожиданно гликан, связанный с PGT121 в полученной авторами кристаллической структуре, не был NA2, а представлял собой N-гликан комплексного типа из соседнего Fab PGT121 в кристаллической решетке; в частности, N-гликан, связанный с Asn105HC. Идентификация гликана была очевидной, поскольку наблюдали электронную плотность для гликозидной связи с Asn105HC и для концевой сиаловой кислоты на антенне Man α 1-3Man (остатки галактозы и сиаловой кислоты антенны Man α 1-6Man не были решены в структуре). Состав связанного гликана соответствует части α 2-6-сиалилированного A2(2-6)-гликана, который связывался антителом PGT121 в экспериментах на микроматрицах (фиг. 7) и ожидаемой сиалильной связи в N-гликанах комплексного типа, связанных с PNGS на белках, экспрессированных в клетках HEK293T. Хотя домены VH-VL такой структуры ("связанного с лигандом" PGT121) накладываются без значимых различий на домены VH-VL структуры PGT121 без связанного N-гликана ("не связанного с лигандом" PGT121) (табл. 10), угол коленчатого изгиба (угол между псевдопарами VH-VL и CH1-CL) в структурах различен. Такое различие, вероятно, отражает гибкость, которая позволяет Fab принимать переменные углы коленчатого изгиба, в зависимости от напряжений кристаллической решетки.

Учитывая, что авторы наблюдали связывание N-гликана комплексного типа в одной кристаллической структуре (структуре "связанного с лигандом" PGT121), но не наблюдали в другой структуре (структуре "не связанного с лигандом" PGT121), авторы оценили, что аффинность PGT121 для N-гликана комплексного типа, не связанного с gp120, находится в диапазоне концентраций PGT121 в кристаллах (~10 мМ). Если предположить, что KD для связывания выделенного гликана находится в диапазоне 1-10 мМ, сравнимом с KD 1,6 мМ, полученным для связывания PG9 с Man5GlcNAc2-Asn, то KD для связывания антителом PGT121 выделенного гликана дает только небольшой вклад в аффинность PGT121 по отношению к gp120, которая находится в наномолярном диапазоне (фиг. 4A).

Гликан в структуре "связанного с лигандом" PGT121 взаимодействует исключительно с доменом VH и осуществляет широкие контакты с остатками во всех трех CDR (площадь скрытой поверхности на PGT121HC=600 Å²). Контакты включают 10 прямых и 18 опосредованных водой водородных связей (табл. 11) с 9 аминокислотами, связывающими гликан между остатком N-ацетилглюкозамина, связанного с маннозой точки ветвления, и концевой сиаловой кислотой на 1-3-антенне. Несколько контактов с PGT121 осуществляются за счет такой сиаловой кислоты, включая три прямых водородных связи с остатками PGT121 Asp31HC и His97HC в дополнение к опосредованным водой водородным связям с Asp31HC. Сиаловая кислота также вносит вклад в опосредованную водой сеть водородных связей внутри гликана. Прямые контакты с сиаловой кислотой могут объяснять более сильное связывание PGT121 с сиалилированным A2(2-6)-гликаном, чем с несиалилированным гликаном NA2 в проведенном авторами изобретения анализе на микроматрице гликанов (фиг. 7).

Обширные опосредованные водой контакты с белками, создаваемые остатками N-

ацетилглюкозамина и галактозы 1-3-антенны, могут объяснять связывание, наблюдаемое в случае несиалилированных одно- и двухантенных гликанов с PGT121 (фиг. 7).

Шесть остатков, способствующие прямым или вероятно осуществляемым через боковые цепи аминокислот контактам с гликанами (Ser32HC-CDRH 1, Lys53HC-CDRH2, Ser54HC-CDRH2, Asn58HC-CDRH2, His97HC-CDRH 3, Thr1001HC-CDRH 3) отличаются от таковых в 10-1074 (Tyr32HC-CDRH 1, Asp53HC-CDRH2, Arg54HC-CDRH2, Thr58HC-CDRH2, Arg97HC-CDRH 3, Tyr1001HC-CDRH 3) и являются высоко консервативными среди PGT121-подобных, но не среди 10-1074-подобных антител. Остатки 10-1074 не имеют соответствующих функциональных групп для осуществления наблюдаемых контактов с гликанами или имеют объемные боковые цепи, которые могут вызывать стерические конфликты. Четыре из таких остатков также отличаются от остатков в GL (Tyr32HC-CDRH 1, Tyr53HC-CDRH2, Gln97HC-CDRH 3, Tyr1001HC-CDRH 3), свидетельствуя о том, что отсутствие связывания 10-1074-подобных антител и GL со свободными от белков гликанами комплексного типа на микроматрицах гликанов является результатом отсутствия водородных связей и/или стерических конфликтов (например, His97PGT121 по сравнению с Arg9710-1074; Thr1001PGT121 по сравнению с Tyr100110-1074). Так как большинство различий последовательностей между PGT121 и 10-1074 сгруппировано в петлях CDRH, в частности, к поверхности щели между CDRH2 и CDRH 3, где авторы наблюдали связанный N-гликан комплексного типа, дифференциальное распознавание гликанов комплексного типа на gp120 может являться причиной некоторых или всех различий в их наблюдаемой тонкой специфичности.

Пример 8. Замена контактирующих с гликанами остатков антитела влияет на нейтрализацию.

Чтобы оценить вклады остатков, контактирующих с N-гликанами комплексного типа, определенными на основании "связанной с лигандами" структуры PGT121, авторы создали два мутантных антитела с целью обмена остатками, контактирующими с гликанами комплексного типа, между PGT121 и 10-1074: IgG 10-1074 с остатками PGT121 (шесть замен в IgH Y32S, D53K, R54S, T58N, R97H, Y1001T) и IgG PGT121 с реципрокными заменами. "Гликомутантные" антитела (10-1074GM и PGT121GM) имели кажущуюся аффинность по отношению к gp120/gp140 YU-2 почти дикого типа, судя по измерениям с использованием SPR (фиг. 2A), что свидетельствует о том, что замены не нарушали связывание с шипом оболочки, полученным из штамма вируса, нейтрализуемого как PGT121, так и 10-1074 (фиг. 1A). Тот факт, что остатки PGT121, контактирующие с N-гликанами комплексного типа, могут размещаться в остове 10-1074 без нарушения связывания с gp120/gp140, связываемым обоими антителами дикого типа, позволяет предполагать общее сходство в связывании антигена, несмотря на тонкие различия в специфичности.

В отличие от PGT121 дикого типа PGT121GM не связывало гликаны в экспериментах с использованием микроматрицы, подтверждая, что остатки 10-1074 в положениях замен не совместимы со связыванием гликанов, свободных от белков (фиг. 2B), и подтверждая, что остатки, контактирующие с гликаном в "связанной с лигандом" структуре PGT121 вовлечены в распознавание гликанов комплексного типа на микроматрицах. 10-1074GM также не связывалось со свободными от белков гликанами (фиг. 2B), свидетельствуя о вовлечении некоторых остатков в дополнение к замененным остаткам в создании участка связывания свободного от белков N-гликана комплексного типа.

Затем использовали основанный на TZM-bl анализ, чтобы сравнить нейтрализацию антителами дикого типа и "гликомутантными" антителами. Авторы тестировали 40 вирусных штаммов, включая штаммы, по-разному резистентные к действию PGT121 или 10-1074, и штаммы, чувствительные к обоим антителам дикого типа (фиг. 2C и табл. 12). В соответствии со связыванием PGT121GM и 10-1074GM с очищенными белками оболочки YU-2 оба мутанта нейтрализовали вирус YU-2; однако 64% PGT121-чувствительных штаммов были резистентными к PGT121GM (фиг. 2C и табл. 12), что свидетельствует о том, что контактирующие с гликанами остатки, идентифицированные в "связанной с лигандом" структуре PGT121, имеют отношение к нейтрализующей активности PGT121. Наоборот, 10-1074GM проявляло более высокую среднюю эффективность, чем 10-1074 дикого типа против 10-1074-чувствительных штаммов (фиг. 2C и табл. 12), включая более чем 3-кратное повышение эффективности против четырех 10-1074-чувствительных штаммов (WITO4160.33, ZM214M.PL15, Ce1172_H1 и 3817.v2.c59). В общем, PGT121-замены в 10-1074 не придавали чувствительности к 10-1074GM PGT121-чувствительным/10-1074-резистентным штаммам, однако два таких штамма (CNE19 и 62357_14_D3_4589) становились чувствительными к 10-1074GM (IC50 = 0,19 мкг/мл и 40,8 мкг/мл, соответственно). Интересно, что были только PGT121-чувствительные/10-1074-резистентные штаммы, которые содержали интатный PNGS, связанный с Asn332gp120. Другие PGT121-чувствительные/10-1074-резистентные штаммы не имеют Asn332gp120-связанного гликана и резистентны к PGT121GM и 10-1074GM, что свидетельствует о том, что в их чувствительность к PGT121 дикого типа вовлечен соседний N-гликан и/или компенсация белковыми частями эпитопа. Хотя существенное приобретение функции наблюдали только в случае 10-1074GM против одного штамма (CNE19), полученный результат вместе с общим улучшением, наблюдаемым в случае 10-1074GM против 10-1074-чувствительных штаммов (фиг. 2C), согласуется с таким объяснением, что кристаллографически идентифицированные контактирующие с гликанами остатки могут переносить свойства распознавания PGT121-подобного антитела на 10-1074 в некоторых контекстах и/или влиять на его эффективность по иному. Кроме того, потеря нейтрализующей активности в случае

PGT121GM против PGT121-чувствительных штаммов свидетельствует, что в нейтрализующую активность PGT121 вовлечены остатки, идентифицированные как контактирующие с N-гликаном комплексного типа в "связанной с лигандом" структуре PGT121.

Результаты.

PGT121 является зависимым от гликанов bN-Ат, которое вначале было идентифицировано в сыворотке донора, инфицированного вирусом клуды А, в функциональном скрининге дающее только два клонально родственные представителя. Триммеры gp140 использовали в качестве "приманки" для сортировки одиночных клеток, выделив при этом 29 новых клональных вариантов. Семейство клонов PGT121 включает отличающиеся группы близкородственных антител: PGT121- и 10-1074-группы. Результаты свидетельствуют, что в эпитопы обеих групп вовлечен PNGS в положении Asn332gp120 и основание петли V3. Группы PGT121-подобных и 10-1074-подобных антител отличаются по аминокислотным последовательностям, аффинностям связывания gp120/gp140 и нейтрализующим активностям, при этом 10-1074-подобные антитела в отношении нейтрализации полностью зависят от интактного PNGS в положении Asn332gp120, тогда как PGT121-подобные антитела способны нейтрализовать некоторые вирусные штаммы, в которых отсутствует PNGS в Asn332gp120.

Значительное различие между двумя группами антител заключается в том, что PGT121-подобные антитела связывают N-гликаны комплексного типа на матрице углеводов, тогда как в случае 10-1074-подобных антител не наблюдают регистрируемого связывания с какими-либо тестированными свободными от белков N-гликанами (фиг. 7). Связывание свободных от белков гликанов анти-ВИЧ-антителами не всегда можно выявить; например, несмотря на то, что PG9 распознает gp120-ассоциированный гликан с высоким содержанием маннозы, на микроматрицах не выявляется связывания со свободными от белков гликанами. Таким образом, хотя позитивный результат, полученный на микроматрице гликанов, подразумевает вовлечение конкретного гликана в эпитоп антитела, отрицательный результат не исключает распознавания гликанов. Например, хотя гликаны с высоким содержанием маннозы не выявляются в экспериментах с использованием микроматрицы гликанов, они могут быть вовлечены в эпитоп PGT121, в соответствии с данными о связывании и нейтрализации форм только с высоким содержанием маннозы белка gp120 и вирионов (фиг. 8).

Молекулярная основа различий между PGT121, 10-1074 и их предшественником GL была выявлена, отчасти, с использованием их кристаллических структур. Данные о том, что большинство соматических мутаций легких цепей являются общими для PGT121 и 10-1074, тогда как мутации в тяжелых цепях отличаются, свидетельствуют, что легкая цепь контактирует с общими частями эпитопа gp120, а тяжелые цепи распознают отличающиеся признаки.

Все три антитела имеют удлиненную CDRH 3 с неполярной верхушкой, которая может обеспечить доступ к скрытым эпитопам. Различия в антигенсвязывающем участке двух зрелых Fab, главным образом, локализованы в щели между CDRH2 и удлиненной CDRH 3. Интересно, что предполагаемая антигенсвязывающая щель между CDRH2 и CDRH 3 также найдена в типичном предшественнике зародышевой линии для PGT121 и 10-1074.

Структурную информацию, касающуюся распознавания гликанов PGT 121-подобными антителами, получили на основании кристаллической структуры, в которой сиалилированный N-гликан комплексного типа, связанный с остатком домена VH, взаимодействовал с участком связывания соседнего Fab PGT121. Несколько признаков "связанной с лигандом" структуры PGT121 свидетельствуют, что она подходит для понимания распознавания N-гликанов комплексного типа на gp120 PGT121-подобными антителами. Во-первых, гликан в структуре соответствует α 2-6-сиалилированному гликану A2(2-6), который антитело PGT121 связывает на микроматрицах (фиг. 7). Во-вторых, гликан взаимодействует с PGT121 с использованием щели между CDRH 3 и CDRH2, которая, как было подтверждено структурными анализами, вовлечена в распознавание эпитопа, что возможно объясняет необычный наклон CDRH 3 в сторону VL в структурах PGT121 и 10-1074. В-третьих, большинство остатков VH, идентифицированных как остатки, взаимодействующие с гликаном, отличаются в PGT121 и 10-1074, что объясняет разные профили связывания на микроматрицах гликанов и возможно объясняет разные тонкие специфичности, выявляемые в экспериментах по связыванию белков. В-четвертых, обмен кристаллографически идентифицированными остатками контакта с гликанами между PGT121 и 10-1074, отчасти, приводит к переносу их свойств: PGT121GM, подобно 10-1074, не связывалось со свободными от белков гликанами, но оба антитела PGT121GM и 10-1074GM сохраняли связывание почти дикого типа с очищенными gp120/gp140 YU-2. Хотя PGT121GM сохраняло способность нейтрализовать некоторые вирусные штаммы, которые подвергались нейтрализации PGT121 и 10-1074 дикого типа, оно не способно было нейтрализовать штаммы, которые являются PGT121-чувствительными/10-1074-резистентными, что свидетельствует о том, что мотив связывания гликана важен для нейтрализующей активности PGT121, направленной против 10-1074-резистентных штаммов. В случае реципрокного обмена эффективность нейтрализации антителом 10-1074GM возрастала или не подвергалась влиянию по сравнению с 10-1074, и в одном случае 10-1074GM потенциально нейтрализовало PGT121-чувствительный/10-1074-резистентный штамм, что согласуется с переносом кристаллографически идентифицированного мотива гликана и гипотезой о том, что эпитопы PGT121- и 10-1074-подобных антител являются родственными. В анализах последователь-

ностей gp120 из штаммов, для которых имеются другие данные о нейтрализации PGT121, отличные от корреляции с PNGS в Asn332gp120 в случае вирусов, чувствительных к PGT121-подобным и 10-1074-подобным антителам, не возникает ясной картины использования PNGS для разных категорий вирусных штаммов (PGT121-чувствительные/10-1074-чувствительные, PGT121-чувствительные/10-1074-резистентные, PGT121-резистентные/10-1074-чувствительные), за исключением 10-1074-резистентных штаммов, в которых обычно отсутствует Asn332gp120-ассоциированный PNGS.

Пример 9. Пассивный перенос нейтрализующих анти-ВИЧ-1-мАТ in-vivo.

Пять выделенных эффективных и обладающих широким спектром действия моноклональных нейтрализующих анти-ВИЧ-антител вводили макакам-резус и через 24 часа заражали их интраректально любым из двух разных SHIV. Объединяя результаты, полученные для 60 зараженных животных, выяснили, что титр для защитной нейтрализации в плазме, предотвращающий появление вирусов у макак, подвергаемых воздействию, на 50%, составляет примерно 1:100.

Эксперименты на животных.

Макаки, используемые в данном исследовании, были негативными по аллелю Mamu-A*01 MHC класса I.

Конструирование R5-тропного SHIVDH12-V3AD8.

Использовали ПЦР-мутагенез с применением праймеров, соответствующих 5'- и 3'-половинам кодирующей области V3 gp120 SHIVAD8EO (PNAS 109, 19769-19774 (2012))

(прямой праймер:

AGAGCATTTTATACAACAGGAGACATAATAGGAGATATAAGACAAGCACATTGCAACATTAGT
AAAGTAAAATGGC

и обратный праймер:

TCCTGGTCSTATATGTATACTTTTCCTTGTATTGTTGTTGGGTCTTGTACAATTAATTTCTAC
AGTTTCATTC),

чтобы ввести такие последовательности V3 в генетический фон молекулярного клона pSHIVDH12_CL7 (J. of Virology 78, 5513-5519 (2004)), используя ДНК-полимеразу Platinum PFX (Invitrogen). После очистки из геля продукт ПЦР обрабатывали полинуклеотидкиназой T4 (GibcoBRL) и лигировали тупыми концами, создавая pSHIVDH12.V3AD8, которую использовали для трансформации компетентных клеток.

Вирусы.

Исходные штаммы вирусов готовили, сначала трансфицируя клетки 293Т молекулярными клонами SHIVAD8EO или SHIVDH12-V3AD8 с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Надосадки культур собирали через 48 часов и аликвоты хранили при -80°C вплоть до использования. Стимулированные конканавалином А РВМС макак-резус (2×10⁶ клеток в 500 мкл) инфицировали надосадками трансфицированных клеток посредством инокуляции при центрифугировании (J. of Virology 74, 10074-10080 (2000)) в течение 1 часа, смешивали с таким же количеством/объемом активированных РВМС и культуры поддерживали, по меньшей мере, в течение 12 дней с ежедневной заменой культуральной среды. Образцы надосадочной среды объединяли вблизи временных точек пика продукции, чтобы получить отдельные исходные вирусные штаммы.

Антитела.

Выделяли и получили одиннадцать моноклональных антител (VRC01, NIH45-46, 45-46G54W, 45-46m2, 3BNC117, 12A12, 1NC9 и 8ANC195, 10-1074, PGT121 и PGT126). DEN3, моноклональное IgG1-антитело человека, специфичное к вирусу денге NS1 (PNAS 109, 18921-18925 (2012)) или контрольный IgG человека (NIH Nonhuman Primate Reagent Resource <http://www.nhpreagents.org>) использовали в качестве негативных контрольных антител в данном исследовании. Моноклональные антитела, выбранные для пассивного переноса до экспозиции, вводили внутривенно за 24 часа до провокационного заражения вирусом.

Количественная оценка уровней вирусной РНК в плазме.

Уровни вирусной РНК в плазме определяли, используя обратную транскрипцию-ПЦР в реальном времени (система детекции последовательностей ABI Prism 7900HT; Applied Biosystems).

Концентрации антител в плазме.

Концентрации вводимых моноклональных антител в плазме макак определяли в твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA), используя рекомбинантный gp120 ВИЧ-1JRFL (Progenies Pharmaceuticals) или ВИЧ III В (Advanced Biotechnology inc.) (J. of Virology 75, 8340-8347 (2001)). Кратко, планшеты для микротитрования покрывали gp120 ВИЧ-1 (2 мкг/мл) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали PBS/0,05% твин-20 и блокировали, используя 1% (об./об.) БСА. После блокирования в планшет добавляли серийные разведения антител или образцов плазмы и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Связывание выявляли с использованием F(ab)₂-фрагментов козы против IgG человека, связанных с щелочной фосфатазой (Pierce), и визуализировали, используя SIGMAFAST OPD (Sigma-Aldrich). Время полураспада нейтрализующих моноклональных антител вычисляли, используя формулу экспоненциального распада, основанную на концентрациях в плазме, начиная на

5 день или 7 день после введения антитела (J. of Virology 84, 1302-1313 (2010)).

Анализ нейтрализации.

Эффективность *in vitro* каждого мАт и нейтрализующую активность, присутствующую в образцах плазмы, собранных у макак-резус, оценивали в анализах нейтрализации двух типов: 1) в анализе проникновения в TZM-bl с использованием псевдотипированного вируса для заражения (AIDS Res. Hum. Retroviruses 26, 89-98 (2010)) или 2) 14-дневный анализ репликации в PBMC с использованием компетентного по репликации вируса (J. of virology 76, 2123-2130 (2002)). В случае анализа на TZM-bl серийно разведенные мАт или образцы плазмы инкубировали с псевдотипированными вирусами, экспрессирующими ген *env*, полученный из SHIVAD8EO или SHIVDH12.V3AD8, и получали в результате котрансфекции клеток 293Т векторами pNLenv1 и pCMV, экспрессирующими соответствующие белки оболочки (J. of Virology 84, 4769-4781 (2010)). Титр для ингибирующей дозы, дающей 50% нейтрализацию (IC50), вычисляли в виде разведения, вызывающего 50% снижение относительных единиц люминесценции (RLU) по сравнению с уровнями в контрольных лунках с вирусом после вычитания RLU клеточного контроля (J. of Virology 84, 1439-1452 (2010)). Фенотип нейтрализации (уровни tier) молекулярного клона SHIVDH12_V3AD8 определяли в анализе на клетках TZM-bl, используя образцы плазмы из когортного исследования, которые проявляли широкий диапазон нейтрализующей активности против изолятов DBX-1 подтипа В (J. of General Virology 91, 2794-2803 (2010)).

Определения защитных титров у животных и статистические анализы.

Вычисление титра нейтрализации в плазме против каждого SHIV R5, приводящего к предотвращению заражения вирусом на 50 или 80% у животных, провокационно заражаемых вирусом, осуществляли, используя способ Reed и Muench (Am. J. Hyg. 27, 493-497 (1938)). Одно животное со значительно выпадающими значениями (DEW7) исключали из вычисления. Пробит-регрессию использовали для моделирования взаимосвязи между титрами в плазме, необходимыми для придания стерилизующего иммунитета *in vivo*, с использованием всех 60 пассивно иммунизированных обезьян (Cambridge University Press, Cambridge, England, ed. 3rd, 2007), при этом р-значения в такой модели основаны на критерии отношения правдоподобия. Титры в плазме, необходимые для разных уровней защиты *in vivo* (33%, 50%, 80%, 90% и 95%) определяли на основании оценок пробит-модели и способа бутстреппинга для создания 90% доверительных интервалов.

Результаты.

SHIVDH12-V3AD8, подобный SHIVAD8EO, обладает свойствами чувствительности к нейтрализации антителами против ВИЧ-1 tier 2 (табл. 13). У макак-резус, которым внутривенно или интаректально инокулировали SHIVDH12-V3AD8, наблюдали пиковую вирусемию в диапазоне от 10⁵ до 10⁷ копий вирусной РНК/мл плазмы на 2-3 неделе после инфекции (PI). У большинства SHIVDH12-V3AD8-инфицированных животных вирусная нагрузка в плазме снижалась до фоновых уровней с 8 по 20 неделю после инфекции.

Чувствительность SHIVAD8EO к нейтрализации 11 недавно описанными анти-ВИЧ-1-мАт с широкой реактивностью сначала определяли в системе анализа TZM-bl (фиг. 11А и В). Мишенью восьми из указанных антител, VRC01, NIH45-46 (23), 45-46G54W, 45-46m2, 3BNC117, 12A12, 1NC9 и 8ANC195, был CD4bs gp120 (Science 333, 1633-1637 (2011)) и три антитела, 10-1074, PGT121 и PGT126 (Nature 477, 466-470 (2011)), зависели от присутствия N332-гликана gp120 ВИЧ-1. При тестировании против SHIVAD8EO все три зависимых от гликанов мАт проявляли большую эффективность, чем CD4bs-МАТ (фиг. 11 А). Значения IC50 для трех мАт, мишенью которых является N332-гликан gp120, были в диапазоне от 0,09 до 0,15 мкг/мл. CD4bs-МАТ проявляли намного более широкий диапазон (от 0,14 до 6,34 мкг/мл) нейтрализующей активности IC50, при этом наиболее эффективным было 3BNC117. Сходную иерархию (гликан-зависимое > CD4bs-зависимого) нейтрализующей эффективности мАт также наблюдали с использованием SHIVDH12-V3AD8, но нейтрализующая активность распределялась в намного более широком диапазоне (>100-кратном) по сравнению со значениями IC50, наблюдаемыми для SHIVAD8EO (фиг. 11В). SHIVDH12-V3AD8 были немного более чувствительными к мАт, нацеленным на гликаны, и более резистентными к мАт, нейтрализующим CD4bs, чем SHIVAD8EO.

На основании результатов, показанных на фиг. 11, пять нейтрализующих мАт были выбраны для исследования пассивного переноса перед экспозицией: VRC01, поскольку оно было первым охарактеризованным CD4bs-N-АТ из вновь выделенных N-Ат широкого диапазона действия; CD4bs-МАТ 45-46m2 и 3BNC117, которые оба проявляли сильную нейтрализующую активность против SHIVAD8EO и SHIVDH12-V3AD8; и зависимые от N332-гликана gp120 мАт, PGT121 и 10-1074.

Протокол экспериментов по пассивному переносу заключался во внутривенном введении уменьшающихся количеств нейтрализующих мАт и интаректальном заражении животных через 24 часа. Целью было блокирование появления вируса в организме, в связи с данными о том, что многократные введения гуманизированных анти-ВИЧ-мАт отдельным макакам могут снижать их эффективность и/или возможно индуцировать анафилактические ответы, выбирали дозу заражения SHIV достаточного размера для того, чтобы обеспечить инфекцию *in vivo* после одной инокуляции. Для этого авторы ранее провели интаректальное титрование SHIVAD8 у макак-резус и сообщили, что инокуляция 1×10³ TCID50, определяемой по конечному разведению PBMC макак-резус, была эквивалентна введению примерно 3

доз, инфицирующих животных на 50% (AID50) (J. of virology 86, 8516-8526 (2012)). Действительно, отдельные интаректальные инокуляции 3 AID50 приводили к успешному развитию инфекции у 10 из 10 макак-резус вирусами SHIVAD8EO или SHIVDH12-V3AD8.

В качестве контроля в первом эксперименте по пассивному переносу животным внутривенно вводили IgG1-мАт против вируса денге NS1 и заражали, используя SHIVAD8EO спустя 24 часа. Обе обезьяны (ML1 и МАА) быстро становились инфицированными с образованием пиковых уровней вирусемии в плазме на 2 неделе после инфекции. VRC01 было первым нейтрализующим анти-ВИЧ-1-мАт, тестируемым в отношении защиты против появления вируса в организме, и его вводили двум макакам в дозе 50 мг/кг. Одна (DEGF) из двух макак, которым была проведена инокуляция, была полностью защищена от заражения SHIVAD8EO без свидетельства вирусемии в плазме или ассоциированной с клетками вирусной ДНК на протяжении 45-дневного периода наблюдения. Другой реципиент, которому инокулировали 50 мг/кг VRC01 (DEN3) становился инфицированным, но пиковая вирусемия в плазме наступала с задержкой вплоть до 5 недели после инфекции. Две другие макаки, которым вводили меньшие количества (20 мг/кг) VRC01 не были защищены от заражения SHIVAD8EO. Полученные результаты суммированы в табл. 13.

Затем исследовали защитные свойства PGT121, направленные против заражения SHIVAD8EO. PGT121 было одним из наиболее эффективных нацеленных на гликаны нейтрализующих мАт, судя по измерениям в анализе TZM-bl (фиг. 11). На основании результатов, полученных с использованием VRC01 для начала титрования *in vivo* мАт PGT121 была выбрана доза 20 мг/кг. Две зараженных обезьяны (KNX и МК4) были резистентными к заражению SHIVAD8EO. Когда животным вводили более низкие количества (т.е., 5 мг/кг, 1 мг/кг или 0,2 мг/кг) PGT121, 1 из 2, 2 из 2 и 0 из 2 животных, соответственно, были защищены (табл. 13).

Способность мАт VRC01 и PGT121 блокировать появление в организме SHIVDH12-V3AD8 оценивали сходным образом (табл. 13). Результаты, полученные с использованием VRC01, были сравнимы с результатами, наблюдаемыми в случае заражения SHIVAD8EO: 1 из 2 реципиентов, получавший 30 мг/кг, был защищен от развития инфекции SHIVDH12-V3AD8. мАт PGT121 были значительно более эффективными, чем VRC01 в предотвращении заражения SHIVDH12-V3AD8: 2 из 2 реципиентов, получавших 0,2 мг/кг PGT121 были резистентными к инфекции. PGT121 также оказалось несколько более эффективным в предотвращении инфекции *in vivo* SHIVDH12-V3AD8 по сравнению с SHIVAD8EO (табл. 13). Полученный результат согласуется с 8-кратным различием в значениях IC50 в случае PGT121 в отношении нейтрализации двух SHIV в анализах *in vitro* (фиг. 11).

Результаты пассивного переноса нейтрализующих мАт 10-1074, 3BNC117 или 45-46m2 макакам-резус с последующим заражением либо SHIVAD8EO, либо SHIVDH12-V3AD8 суммированы в табл. 13. мАт 10-1074 эффективно блокировало заражение *in vivo* обоими SHIV. мА CD4bs 3BNC117 и 45-46m2 были выбраны для пассивного переноса макакам на основании их значений IC50 против обоих SHIV в эксперименте по нейтрализации *in vitro*, показанных на фиг. 11. 3BNC117 успешно блокировало инфекцию SHIVAD8EO у 2 из 2 обезьян в дозе 5 мг/кг, но не у 2 других животных, которые получали дозу 1 мг/кг (табл. 13). Полученные данные были сходны с результатами, наблюдаемыми в том случае, когда одинаковые количества 3BNC117 вводили макакам, зараженным SHIVDH12-V3AD8: 1 из 2 становилась инфицированной в случае дозы 5 мг/кг; 1 из 2 становилась инфицированной в случае дозы 1 мг/кг.

Образцы плазмы, собранные в различных временных точках от макак, которым проводили пассивный перенос, анализировали в ELISA gp120 ВИЧ-1, чтобы определить концентрации нейтрализующих мАт. В общем, концентрации в плазме каждого мАт во время заражения (через 24 часа после введения антитела) коррелировали с дозой вводимого антитела (табл. 13).

Взаимосвязи концентраций мАт в плазме с защитой *in vivo* показаны на фиг. 12. Из 5 оцениваемых нейтрализующих мАт PGT121 было явно наиболее эффективным против обоих вирусов, при этом SHIVDH12-V3AD8 проявлял немного более высокую чувствительность к такому мАт (2 из 2 обезьян были защищены при концентрации в плазме 0,2 мкг/мл). Напротив, требовалась концентрация в плазме VRC01 почти 400 мкг/мл, чтобы защитить 1 из 2 животных от такого же используемого для заражения вируса SHIVDH12-V3AD8 (табл. 13). Наиболее эффективное CD4bs-МАТ, вводимое макакам в данном исследовании, 3BNC117, было примерно в 6-10 раз более эффективным, чем VRC01 в предотвращении заражения любым SHIV (фиг. 12, табл. 13).

Вычисленные времена полужизни мАт PGT121, 10-1074, 3BNC117, и VRC01 были очень сходны: 3,5 суток, 3,5 суток, 3,3 суток и 3,1 суток, соответственно. Напротив, время полужизни 45-46m2 было чрезвычайно коротким и его нельзя было определить. Исходя из того, что концентрации мАт в плазме у нескольких макак через 24 часа после введения 20 мг/кг гуманизированных нейтрализующих мАт (т.е., примерно 250 мкг/мл [табл. 13]), а две обезьяны, получающие 20 мг/кг 45-46m2 имели концентрации мАт в плазме только 15,0 и 17,6 мкг/мл, распад составлял более 95% относительно других нейтрализующих мАт во временной точке 24 ч.

Титры нейтрализации измеряли в образцах плазмы, собранных через 24 часа после введения мАт, когда макак заражали вирусами SHIVAD8EO или SHIVDH12-V3AD8. Как показано в табл. 13, наблюдали хорошую корреляцию между титрами противовирусных нейтрализующих антител в плазме и защитой

от инфекции SHIV. Введение двух зависимых от гликанов мАт (PGT121 и 10-1074) явно приводило к наиболее высоким титрам нейтрализующей анти-ВИЧ-1-активности во время заражения вирусом. Титры, измеренные у реципиентов мАт 45-46m2 были на уровне пределов регистрации или не регистрировались вследствие чрезвычайно короткого времени полужизни *in vivo*.

Способ, описанный Reed и Muench (Am. J. Hyg. 27, 493-497 (1938)), использовали для вычисления титров нейтрализации, измеренных в плазме, необходимых для профилактики приобретения вирусов у 50% заражаемых обезьян. Такие защитные титры для 28 обезьян, заражаемых SHIVAD8EO, или 32 обезьян, заражаемых SHIVDH12-V3AD8, рассчитывали отдельно (табл. 15 и 16). Титры нейтрализации в плазме, необходимые для защиты 50% животных, заражаемых SHIVAD8EO или SHIVDH12-V3AD8, вычисляли как 1:115 и 1:96, соответственно. Поскольку такие сходные титры были получены после: 1) заражения SHIV и идентичными путями и с использованием идентичного размера инокулята и 2) введения такого же набора нейтрализующих мАт, данные по нейтрализации для всех 60 животных объединяли и подвергали пробит-регрессионному анализу, чтобы исследовать взаимосвязь между титрами нейтрализации в плазме и защитой *in vivo*. В случае следующей проверки, когда в качестве члена включали вирус SHIV в регрессионную пробит-модель для всех 60 макак, не получали доказательств различия между двумя вирусами SHIV ($p=0,16$). В случае применения по отношению ко всей группе из 60 макак пробит-регрессия позволила оценить, что титры нейтрализации в плазме 1:104 могут предотвращать приобретение вируса у 50% животных. По оценкам, полученным в пробит-анализе титры 50% нейтрализации в плазме 1:57 или 1:329 могут защищать 33% или 80%, соответственно, подвергнутых воздействию животных.

Пример 10. Введение нейтрализующих мАт в моделях *in vivo*, хронически инфицированных ВИЧ.

Краткое описание способов: Активности в нейтрализации нейтрализующих мАт 3BNC11724 и 10-107423 широкого действия против SHIVAD8EO сначала определяли в системе клеток TZM-bl против SHIVAD8EO. Их способности блокировать приобретение вируса или контролировать вирусемии в плазме у хронически инфицируемых животных, заражаемых R5-тропным SHIVAD8EO, оценивали, наблюдая вирусную нагрузку в плазме и ассоциированные с клетками вирусные нуклеиновые кислоты; уровни подгрупп Т-клеток CD4+ измеряли проточной цитометрией. Осуществляли SGA-анализы циркулирующих вариантов вирусов и определение уровней антител в плазме. Концентрацию в плазме N-Ат определяли, измеряя нейтрализующую активность против препаратов псевдовирuсов ВИЧ-1, чувствительных либо только к 10-1074, либо только к 3BNC117.

Результаты.

Оценивали две группы хронически инфицированных макак. Первая группа состояла из двух не имеющих клинических симптомов животных (DBZ3 и DC99A), которых инфицировали в течение 159 недель и которые имели сходные и значимые снижения количества циркулирующих Т-клеток CD4+ (табл. 17). Схема лечения текущей инфекции SHIV заключалась в совместном введении 101074 и 3BNC117 в дозе 10 мг/кг. Во время введения мАт вирусные нагрузки в плазме у макак DBZ3 и DC99A составляли $1,08 \times 10^4$ и $7,6 \times 10^3$ копий РНК/мл, соответственно. Обе макаки отвечали на комбинированное лечение анти-ВИЧ-1-мАт немедленным и быстрым снижением вирусемии в плазме до нерегистрируемых уровней в течение 7-10 дней. Подавление измеряемого SHIVAD8EO в плазме макак DBZ3 и DC99A после одного введения двух мАт продолжалось 27 и 41 день, соответственно. В каждом случае вирусемия в плазме возвращалась к уровням до лечения.

Вторую группу из трех животных (DBX3, DCF1, и DCM8), каждое из которых также было инфицировано SHIVAD8EO в течение более чем 3 лет, и у которых имелись клинические симптомы с перемежающейся диареей и/или анорексией, лечили двумя нейтрализующими антителами (табл. 17). Во время введения мАт уровень циркулирующих Т-клеток CD4+ у макаки DCM8 составлял только 43 клетки/мкл, и он был немного выше у животных DCF1 (105 клеток/мкл) и DBXE (158 клеток/мкл). Вирусные нагрузки в плазме превышали 105 копий РНК/мл у животных DBXE и DCF1 и были значимо ниже ($1,59 \times 10^3$ копий РНК/мл) у обезьяны DCM8. Введение двух мАт обезьяне DBXE приводило к двухфазному снижению вирусемии с $2,0 \times 10^5$ копий РНК в 0 день до нерегистрируемых уровней в плазме на 20 день. Вслед за этим в течение нескольких дней происходило возвращение высоких уровней циркулирующего вируса у DBXE. У макаки DCM8 с более низкой вирусной нагрузкой в плазме и очень небольшим количеством циркулирующих Т-клеток CD4+ наблюдали быстрое снижение вирусемии до нерегистрируемых уровней с 6 по 20 день после начала лечения мАт. Наконец, у животного DCF1, у которого, как сообщалось ранее, образовывались N-Ат против ВИЧ-1 широкого спектра действия, наблюдали временное и сравнительно небольшое 27-кратное снижение вирусемии в плазме к 6 дню в ответ на комбинированную терапию мАт, затем вирусная нагрузка возвращалась к высоким уровням, которые были до лечения.

Также определяли уровни связанной с РВМС РНК и ДНК до и после введения антитела (табл. 18). В случае каждого животного обработка мАт приводила к пониженным уровням ассоциированной с клетками вирусной РНК, что хорошо коррелирует с измерениями вирусной нагрузки в плазме. Не наблюдали закономерности в отношении связанных с клетками уровней вирусной ДНК в результате лечения антителами. Введение нейтрализующих мАт хронически инфицированным SHIVAD8EO обезьянам также оказывало полезное влияние на уровни циркулирующих Т-клеток CD4+, в частности, у животных с

очень высокой вирусной нагрузкой. Количество Т-клеток CD4+ у макак DBXE и DCF1 повышалось в 2-3 раза в течение периода опосредованного моноклональными антителами подавления вирусов, но постепенно снижалось до уровней, наблюдаемых до лечения, по мере того как вирусемия снова можно было зарегистрировать.

Концентрации в плазме каждого мАт определяли, измеряя нейтрализующую активность в плазме против выбранных штаммов псевдовирuсов ВИЧ-1, чувствительных к одному или другому, но не к обоим антителам (фиг. 13А). У каждого подвергнутого лечению животного подавление вирусемии SHIVAD8EO сохранялось вплоть до тех пор, пока не достигалась пороговая концентрация мАт в плазме примерно от 1 до 3 мкг/мл (фиг. 13В и 13С). Даже имел место случай у макаки DCF1, когда наблюдали небольшое и временно снижение уровней вирусной РНК в плазме. Интересно, что мАт, вводимые макакам DCM8 и DCF1 с клиническими симптомами, имели укороченное время полужизни или их невозможно было обнаружить. Как указано ранее, макака DCM8 имела чрезвычайно низкие уровни Т-клеток CD4+ (43 клетки/мкл плазмы) и макака DCF1 была подвергнута эвтаназии на 56 день после начала лечения из-за ее ухудшающегося клинического состояния. Некропсия DCF1 выявила тяжелую энтеропатию, характеризующую диссеминированным криптоспориозом желудочно-кишечного тракта, панкреатитом и холангитом.

SGA-анализ использовали для определения того, появились ли аминокислотные замены в областях gp120, которые, как показано ранее, влияют на чувствительность к мАт 10-1074 или 3BNC117. В каждом случае рецидивирующий вирус, присутствующий в плазме после иммунотерапии, не был изменен. Чтобы дополнительно проверить чувствительность вновь появляющихся вирусов, комбинированную терапию 10-1074 плюс 3BNC117 (10 мг/кг каждого) вводили повторно двум обезьянам без клинических симптомов (DBZ3 и DC99A). Вирусная нагрузка у каждого животного снова быстро падала, становясь нерегистрируемой на 7 день второго цикла иммунотерапии. Вирусемия была подавлена в течение 7 дней у макаки DBZ3 и более 21 дня у обезьяны DC99A. Вместе взятые, полученные результаты свидетельствуют о том, что повторное появление вируса после первого цикла лечения у таких двух животных отражает недостаточные уровни мАт in vivo, а не резистентность вируса в результате селекции в присутствии антител.

Таблица 3

Репертуар клональных вариантов PGT121 и 10-1074

| pt10 mAb# | VH | DH | JH | CDR3' | VHmut | Длина' | (-) | (+) | Y | Lc | V _L | J _L | CDR3' | V _L mut | FRW1_del | FRW3_ins | Длина' | (-) | (+) | Y | |
|-----------|------|----------|----|----------------------------|-------|--------|-----|-----|---|----|----------------|----------------|---------------|--------------------|----------|----------|--------|-----|-----|---|---|
| 10-160 | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 49 | 24 | 2 | 3 | 4 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 10-186 | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 52 | 24 | 2 | 3 | 4 | λ | 3-21 | 3 | HMWDSRSFGFSWS | 47 | 12 | 3 | 12 | 1 | 2 | 0 | |
| 10-248 | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 46 | 24 | 2 | 3 | 4 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 10-259* | 4-59 | / | 6 | TKHGRRYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 63 | 24 | 2 | 4 | 3 | λ | 3-21 | 3 | HIYDARGGTNWV | 58 | 21 | 3 | 12 | 1 | 2 | 1 | |
| 10-266 | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 49 | 24 | 2 | 3 | 4 | λ | 3-21 | 3 | HMWDSRSFGFSWS | 46 | 12 | 3 | 12 | 1 | 2 | 0 | |
| 10-267 | 4-59 | / | 6 | AQQGKRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDA | 58 | 24 | 2 | 2 | 5 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 10-303* | 4-59 | 3-3/9 | 6 | TLHGRRYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 54 | 24 | 2 | 3 | 3 | λ | 3-21 | 3 | HIWDSRVPTKWV | 50 | 21 | 3 | 12 | 1 | 3 | 0 | |
| 10-354 | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 48 | 24 | 2 | 3 | 4 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 10-410* | 4-59 | 3-10/3 | 6 | ALHGKRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 63 | 24 | 2 | 3 | 3 | λ | 3-21 | 3 | HIWDSRRPTNWV | 44 | 21 | 3 | 12 | 1 | 3 | 0 | |
| 10-416 | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 47 | 24 | 2 | 3 | 4 | λ | 3-21 | 3 | HMWDSRSFGFSWS | 45 | 12 | 3 | 12 | 1 | 2 | 0 | |
| 10-468 | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 47 | 24 | 2 | 3 | 4 | λ | 3-21 | 3 | HMWDSRSFGFSWS | 46 | 12 | 3 | 12 | 1 | 2 | 0 | |
| 10-543 | 4-59 | 3-10/3 | 6 | ALHGKRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 60 | 24 | 2 | 3 | 3 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 10-570 | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 42 | 24 | 2 | 3 | 4 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 10-621 | 4-59 | 3-3/9 | 6 | TLHGRRYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 54 | 24 | 2 | 3 | 3 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 10-664 | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 47 | 24 | 2 | 3 | 4 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 10-720 | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 49 | 24 | 2 | 3 | 4 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 10-730 | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 48 | 24 | 2 | 3 | 4 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 10-814 | 4-59 | 3-10 | 6 | TQQGKRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDA | 43 | 24 | 2 | 3 | 4 | λ | 3-21 | 3 | HKWDSRSPLSWV | 52 | 15 | 3 | 12 | 1 | 3 | 0 | |
| 10-847* | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 47 | 24 | 2 | 3 | 4 | λ | 3-21 | 3 | HMWDSRSFGFSWS | 46 | 12 | 3 | 12 | 1 | 2 | 0 | |
| 10-948 | 4-59 | 3-3/9 | 6 | TLHGRRYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 55 | 24 | 2 | 3 | 3 | λ | 3-21 | 3 | HIWDSRVPTKWV | 46 | 21 | 3 | 12 | 1 | 3 | 0 | |
| 10-996 | 4-59 | 3-3/10 | 6 | TQQGKRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDA | 41 | 24 | 2 | 3 | 4 | λ | 3-21 | 3 | HKWDSRSPLSWV | 50 | 15 | 3 | 12 | 1 | 3 | 0 | |
| 10-1022 | 4-59 | 3-3 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 51 | 24 | 2 | 3 | 4 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 10-1059 | 4-59 | 3-3/16 | 6 | TKHGRRYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 59 | 24 | 2 | 4 | 3 | λ | 3-21 | 3 | HIYDARRPTNWV | 46 | 21 | 3 | 12 | 1 | 3 | 1 | |
| 10-1074* | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 49 | 24 | 2 | 3 | 4 | λ | 3-21 | 3 | HMWDSRSFGFSWS | 45 | 12 | 3 | 12 | 1 | 2 | 0 | |
| 10-1074* | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 49 | 24 | 2 | 3 | 4 | λ | 3-21 | 3 | HMWDSRSFGFSWS | 45 | 12 | 3 | 12 | 1 | 2 | 0 | |
| 10-1121* | 4-59 | 3-10/3-3 | 6 | ALHGKRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 63 | 24 | 2 | 3 | 3 | λ | 3-21 | 3 | HIWDSRRPTNWV | 44 | 21 | 3 | 12 | 1 | 3 | 0 | |
| 10-1130* | 4-59 | 3-10/3-3 | 6 | ALHGKRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 60 | 24 | 2 | 3 | 3 | λ | 3-21 | 3 | HIWDSRRPTNWV | 42 | 21 | 3 | 12 | 1 | 3 | 0 | |
| 10-1141* | 4-59 | 3-10/3-3 | 6 | ALHGKRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 63 | 24 | 2 | 3 | 3 | λ | 3-21 | 3 | HIWDSRRPTNWV | 45 | 21 | 3 | 12 | 1 | 3 | 0 | |
| 10-1146* | 4-59 | 3-10 | 6 | AQQGKRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDA | 58 | 24 | 2 | 2 | 5 | λ | 3-21 | 3 | HYWDSRSPISWV | 61 | 15 | 3 | 12 | 1 | 2 | 1 | |
| 10-1151 | 4-59 | 3-3 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 48 | 24 | 2 | 3 | 4 | λ | 3-21 | 3 | HMWDSRSFGFSWS | 46 | 12 | 3 | 12 | 1 | 2 | 0 | |
| 10-1167 | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 49 | 24 | 2 | 3 | 4 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 10-1223 | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 47 | 24 | 2 | 3 | 4 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 10-1232 | 4-59 | 3-10/3-3 | 6 | ALHGKRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 58 | 24 | 2 | 3 | 3 | / | 3-21 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 10-1263 | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 49 | 24 | 2 | 3 | 4 | λ | 3-21 | 3 | HMWDSRSFGFSWS | 46 | 12 | 3 | 12 | 1 | 2 | 0 | |
| 10-1294 | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 49 | 24 | 2 | 3 | 4 | λ | 3-21 | 3 | HMWDSRSFGFSWS | 45 | 12 | 3 | 12 | 1 | 2 | 0 | |
| 10-1341* | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 49 | 24 | 2 | 3 | 4 | λ | 3-21 | 3 | HMWDSRSFGFSWS | 45 | 12 | 3 | 12 | 1 | 2 | 0 | |
| 10-1342 | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 48 | 24 | 2 | 3 | 4 | λ | 3-21 | 3 | HMWDSRSFGFSWS | 46 | 12 | 3 | 12 | 1 | 2 | 0 | |
| 10-1369* | 4-59 | 3-3/16 | 6 | TKHGRRYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 57 | 24 | 2 | 4 | 3 | λ | 3-21 | 3 | HIYDARRPTNWV | 43 | 21 | 3 | 12 | 1 | 3 | 1 | |
| 10-1476 | 4-59 | 3-3/16 | 6 | ARRGQRIYGVVVSFGFEFFYYYSMDV | 47 | 24 | 2 | 3 | 4 | λ | 3-21 | 3 | HMWDSRSFGFSWS | 46 | 12 | 3 | 12 | 1 | 2 | 0 | |

VHmut и VLmut означают общее количество мутаций в генах VH и VL Ig. (-) и (+) означают количества отрицательно и положительно заряженных аминокислот в определяющей комплементарности об-

ласти (CDR3) Ig, соответственно. Y указывает количество остатков тирозина в CDR5 IgH/L (зеленые).¹ На основе номенклатуры Kabat (IgBLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>). Кислые и основные аминокислоты указаны красным и синим, соответственно). FRW1_del, количество делетированных нуклеотидов в каркасной области 1 (FRW1) IgL. FRW3_ins, количество встроенных нуклеотидов в каркасной области 3 (FRW3) IgL. Цветовой окраской обозначены клональные представители с идентичными последовательностями IgH, и среди них идентичность последовательностей IgL, которая определяет клоны, указана жирным шрифтом. * указаны типичные варианты антител, которые были получены и проанализированы. IgL 10-266 не клонировали, а IgG 10-1141 не получали.

Таблица 4

| Анализ нейтрализации in vitro с использованием TZM-bl на основной панели | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|--------|---------|--------|---------|
| IC50 | 10-1369 | 10-259 | PGT121 | 10-303 | 10-410 | 10-1130 | 10-1121 | 10-1146 | 10-996 | 10-1341 | 10-847 | 10-1074 |
| BaL.26 | 0.069 | 0.021 | 0.021 | 0.045 | 0.016 | 0.013 | 0.046 | 0.064 | 0.045 | 0.032 | 0.022 | 0.033 |
| SS1196.1 | 0.033 | 0.012 | 0.008 | 0.015 | 0.008 | 0.008 | 0.029 | 0.027 | 0.007 | 0.011 | 0.006 | 0.010 |
| 6535.3 | 0.023 | 0.005 | 0.007 | 0.014 | 0.003 | 0.003 | 0.008 | 0.022 | 0.018 | 0.009 | 0.011 | 0.007 |
| QH0692.42 | 0.503 | 0.155 | 1.085 | 3.122 | 2.630 | 4.871 | 4.187 | 0.590 | 0.395 | 0.335 | 0.259 | 0.259 |
| TRJO4551.58 | 0.569 | 0.189 | 3.896 | 14.401 | 18.511 | 36.880 | 15.360 | 0.548 | 0.516 | 0.333 | 0.210 | 0.170 |
| SC422661.8 | 0.195 | 0.096 | 0.263 | 0.333 | 0.132 | 0.070 | 0.173 | 0.195 | 0.255 | 0.189 | 0.137 | 0.145 |
| PVO.4 | 0.225 | 0.175 | 0.147 | 0.670 | 0.494 | 0.385 | 0.570 | 0.310 | 0.211 | 0.236 | 0.172 | 0.178 |
| CAAN5342.A2 | 0.070 | 0.020 | 0.013 | 0.020 | 0.012 | 0.009 | 0.033 | 0.032 | 0.007 | 0.009 | 0.006 | 0.007 |
| YU-2 | 0.210 | 0.135 | 0.098 | 0.190 | 0.089 | 0.078 | 0.152 | 0.275 | 0.256 | 0.234 | 0.161 | 0.143 |
| R1166.c1 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 |
| MuLV | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 |
| IC80 | 10-1369 | 10-259 | PGT121 | 10-303 | 10-410 | 10-1130 | 10-1121 | 10-1146 | 10-996 | 10-1341 | 10-847 | 10-1074 |
| BaL.26 | 0.268 | 0.101 | 0.081 | 0.156 | 0.066 | 0.062 | 0.154 | 0.203 | 0.228 | 0.159 | 0.112 | 0.124 |
| SS1196.1 | 0.033 | 0.037 | 0.030 | 0.055 | 0.030 | 0.037 | 0.098 | 0.073 | 0.040 | 0.040 | 0.026 | 0.027 |
| 6535.3 | 0.060 | 0.022 | 0.041 | 0.053 | 0.021 | 0.013 | 0.033 | 0.078 | 0.085 | 0.038 | 0.044 | 0.044 |
| QH0692.42 | 1.714 | 0.551 | 14.976 | 18.122 | 12.071 | >40 | 21.943 | 1.993 | 1.404 | 1.100 | 0.908 | 0.861 |
| TRJO4551.58 | 3.818 | 0.965 | 26.930 | >40 | >40 | >40 | >23 | 2.604 | 4.265 | 1.226 | 0.768 | 0.693 |
| SC422661.8 | 0.940 | 0.333 | 0.714 | 1.156 | 0.449 | 0.264 | 0.741 | 0.663 | 0.845 | 0.501 | 0.386 | 0.392 |
| PVO.4 | 0.787 | 0.716 | 1.097 | 2.199 | 1.572 | 1.783 | 2.465 | 1.319 | 1.715 | 0.754 | 0.774 | 0.766 |
| CAAN5342.A2 | 0.186 | 0.063 | 0.056 | 0.092 | 0.055 | 0.045 | 0.095 | 0.088 | 0.060 | 0.054 | 0.035 | 0.044 |
| YU-2 | 0.738 | 0.382 | 0.356 | 0.502 | 0.243 | 0.313 | 0.340 | 0.750 | 0.891 | 0.766 | 0.537 | 0.398 |
| R1166.c1 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | >23 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 |
| MuLV | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | >23 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 |

Цифрами указаны концентрации IgG-антител в мкг/мл для достижения IC50 (вверху) и IC80 (внизу) в анализе нейтрализации TZM-bl. Значения IC50/80 кодированы цветом, и возрастающая чувствительность к нейтрализации указана от темно-зеленого до темно-красного цвета. > показывает, что IC50 для данного вируса не была достигнута при тестируемой концентрации. Вирус лейкозы мышей (MuLV) и R1166.c1 (клада AE) являются негативными контролями.

Анализ нейтрализации in vitro с использованием TZM-bl на расширенной панели значения IC₅₀

| Вирус ID | Клада | 10-996 | 10-1074 | PGT121 | Вирус ID | Клада | 10-996 | 10-1074 | PGT121 |
|--------------------|---------|--------|---------|--------|-----------------|----------------|--------|---------|--------|
| 6535.3 | B | 0.017 | 0.014 | 0.006 | CNE58 | BC | 0.570 | 0.267 | >50 |
| QH0692.42 | B | 0.396 | 0.191 | 1.041 | MS208.A1 | A | >50 | >50 | >50 |
| SC422661.8 | B | 0.173 | 0.091 | 0.101 | Q23.17 | A | 0.008 | 0.006 | 0.010 |
| PVO.4 | B | 0.186 | 0.074 | 0.131 | Q461.e2 | A | >50 | >50 | >50 |
| TRO.11 | B | 0.012 | 0.008 | 0.005 | Q769.d22 | A | >50 | >50 | >50 |
| AC10.0.29 | B | 0.067 | 0.022 | 0.037 | Q259.d2.17 | A | >50 | >50 | 8.990 |
| RHPA4259.7 | B | 0.034 | 0.021 | 0.014 | Q842.d12 | A | >50 | >50 | 0.023 |
| THRO4156.18 | B | >50 | >50 | >50 | 3415.v1.c1 | A | 36.876 | >50 | >50 |
| REJO4541.67 | B | >50 | >50 | 3.607 | 3365.v2.c2 | A | 0.286 | 0.131 | 0.921 |
| TRJO4551.58 | B | 1.147 | 0.170 | 3.728 | 0260.v5.c36 | A | 0.160 | 0.099 | 0.054 |
| WITO4160.33 | B | 0.538 | 0.185 | 0.459 | 191955_A11 | A (T/F) | >50 | >50 | >50 |
| CAAN5342.A2 | B | 0.013 | 0.007 | 0.011 | 191084 B7-19 | A (T/F) | 0.057 | 0.032 | 0.042 |
| YU-2 | B | 0.256 | 0.143 | 0.098 | 9004SS_A3_4 | A (T/F) | 0.072 | 0.011 | 0.008 |
| WEAU_d15_410_787 | B (T/F) | 0.147 | 0.104 | 0.083 | T257-31 | CRF02_AG | >50 | >50 | >50 |
| 1006_11_C3_1601 | B (T/F) | 0.001 | 0.003 | 0.006 | 928-28 | CRF02_AG | 1.331 | 0.847 | >50 |
| 1054_07_TC4_1499 | B (T/F) | 0.260 | 0.129 | 0.115 | 263-8 | CRF02_AG | 10.919 | 0.666 | 3.347 |
| 1056_10_TA11_1826 | B (T/F) | 0.117 | 0.038 | 0.066 | T250-4 | CRF02_AG | <0.001 | <0.001 | 0.001 |
| 1012_11_TC21_3257 | B (T/F) | 0.018 | 0.008 | 0.006 | T251-18 | CRF02_AG | 0.939 | 1.081 | >50 |
| 6240_08_TA5_4622 | B (T/F) | 0.095 | 0.068 | 0.128 | T278-50 | CRF02_AG | 14.010 | 2.146 | >50 |
| 6244_13_B5_4576 | B (T/F) | 0.353 | 0.202 | 0.249 | T255-34 | CRF02_AG | 28.389 | >50 | 6.725 |
| 62357_14_D3_4589 | B (T/F) | 29.300 | >50 | 1.036 | 211-9 | CRF02_AG | 0.750 | 0.112 | 1.455 |
| SC05_8C11_2344 | B (T/F) | 0.069 | 0.052 | 0.093 | 235-47 | CRF02_AG | 0.128 | 0.050 | 0.332 |
| Du156.12 | C | 0.016 | 0.015 | 0.007 | 620345.c01 | CRF01_AE | >50 | >50 | >50 |
| Du172.17 | C | 0.173 | 0.121 | 0.115 | CNE8 | CRF01_AE | >50 | >50 | >50 |
| Du422.1 | C | 0.056 | 0.045 | 0.029 | C1080.c03 | CRF01_AE | >50 | >50 | >50 |
| ZM197M.PB7 | C | >50 | >50 | >50 | R2184.c04 | CRF01_AE | >50 | >50 | >50 |
| ZM214M.PL15 | C | 0.413 | 0.174 | 0.236 | R1166.c01 | CRF01_AE | >50 | >50 | >50 |
| ZM233M.PB6 | C | 0.856 | 0.060 | 1.451 | C2101.c01 | CRF01_AE | >50 | >50 | >50 |
| ZM249M.PL1 | C | >50 | >50 | >50 | C3347.c11 | CRF01_AE | >50 | >50 | >50 |
| ZM53M.PB12 | C | >50 | >50 | <0.001 | C4118.c09 | CRF01_AE | >50 | >50 | >50 |
| ZM109F.PB4 | C | >50 | >50 | 7.894 | CNE5 | CRF01_AE | >50 | >50 | >50 |
| ZM135M.PL10a | C | 0.099 | 0.069 | 0.576 | BJOX009000.02.4 | CRF01_AE | >50 | >50 | 3.626 |
| CAP45.2.00.G3 | C | >50 | >50 | 0.086 | BJOX015000.11.5 | CRF01_AE (T/F) | >50 | >50 | >50 |
| CAP210.2.00.E8 | C | 24.793 | >50 | 5.082 | BJOX010000.06.2 | CRF01_AE (T/F) | >50 | >50 | >50 |
| HIV-001428-2.42 | C | 0.040 | 0.044 | 0.026 | BJOX025000.01.1 | CRF01_AE (T/F) | >50 | >50 | >50 |
| HIV-0013095-2.11 | C | 31.631 | >50 | >50 | BJOX028000.10.3 | CRF01_AE (T/F) | >50 | >50 | >50 |
| HIV-16055-2.3 | C | >50 | >50 | 0.444 | X1193.c1 | G | 0.144 | 0.083 | 0.045 |
| HIV-16845-2.22 | C | 1.325 | 1.169 | 12.685 | P0402.c2_11 | G | 0.022 | 0.012 | 0.020 |
| Ce1086_B2 | C (T/F) | >50 | >50 | <0.001 | X1254.c3 | G | 0.121 | 0.089 | 0.056 |
| Ce0393_C3 | C (T/F) | >50 | >50 | >50 | X2088.c9 | G | 0.002 | 0.003 | 0.011 |
| Ce1176_A3 | C (T/F) | 0.043 | 0.019 | 0.017 | X2131_C1_B5 | G | 0.009 | 0.016 | 0.015 |
| Ce2010_F5 | C (T/F) | >50 | >50 | >50 | P1981_C5_3 | G | 0.005 | 0.005 | 0.004 |
| Ce0682_E4 | C (T/F) | >50 | >50 | >50 | X1632_S2_B10 | G | >50 | >50 | >50 |
| Ce1172_H1 | C (T/F) | 0.058 | 0.047 | 0.023 | 3016.v5.c45 | D | >50 | >50 | >50 |
| Ce2060_G9 | C (T/F) | >50 | >50 | >50 | A07412M1.vrc12 | D | 0.008 | <0.001 | 0.001 |
| Ce703010054_2A2 | C (T/F) | >50 | >50 | >50 | 231965.c01 | D | >50 | >50 | >50 |
| BF1266.431a | C (T/F) | >50 | >50 | >50 | 231966.c02 | D | >50 | >50 | >50 |
| 246F C1G | C (T/F) | 0.092 | 0.022 | 0.083 | 191821_E6_1 | D (T/F) | >50 | >50 | >50 |
| 249M B10 | C (T/F) | >50 | >50 | >50 | 3817.v2.c59 | CD | 8.147 | 3.148 | >50 |
| ZM247v1(Rev-) | C (T/F) | 0.055 | 0.042 | 0.027 | 6480.v4.c25 | CD | 0.000 | 0.009 | 0.017 |
| 7030102001E5(Rev-) | C (T/F) | 0.013 | 0.006 | 0.010 | 6952.v1.c20 | CD | 0.044 | 0.037 | 0.085 |
| 1394C9G1(Rev-) | C (T/F) | 0.086 | 0.050 | 0.486 | 6811.v7.c18 | CD | 0.001 | 0.002 | 0.004 |
| Ce704809221_1B3 | C (T/F) | 0.243 | 0.139 | 0.098 | 89-F1_2_25 | CD | >50 | >50 | >50 |
| CNE19 | BC | 3.452 | 50.000 | 0.018 | 3301.v1.c24 | AC | 0.076 | 0.013 | 0.014 |
| CNE20 | BC | <0.001 | <0.001 | 0.002 | 6041.v3.c23 | AC | >50 | >50 | >50 |
| CNE21 | BC | 0.086 | 0.067 | 0.020 | 6540.v4.c1 | AC | >50 | >50 | >50 |
| CNE17 | BC | 4.040 | 2.686 | 45.289 | 6545.v4.c1 | AC | >50 | >50 | >50 |
| CNE30 | BC | 0.614 | 0.363 | 0.101 | 0815.v3.c3 | ACD | 0.061 | 0.030 | 0.022 |
| CNE52 | BC | 4.525 | 1.226 | 3.741 | 3103.v3.c10 | ACD | 0.053 | 0.037 | 0.042 |
| CNE53 | BC | 0.057 | 0.039 | 0.055 | | | | | |

Цифрами указаны концентрации IgG-антител в мкг/мл для достижения IC₅₀ в анализе нейтрализации TZM-bl. Значения IC₅₀ кодированы цветом, и возрастающая чувствительность к нейтрализации указана от темно-зеленого до темно-красного цвета. ">" показывает, что IC₅₀ для данного вируса не была достигнута при тестируемой концентрации.

Анализ нейтрализации in vitro с использованием TZM-bl на расширенной панели - значения IC80

| ID Вируса | Клада | 10-896 | 10-1074 | PGT121 | ID Вируса | Клада | 10-896 | 10-1074 | PGT121 |
|--------------------|---------|--------|---------|--------|-----------------|----------------|--------|---------|--------|
| 6535.3 | B | 0.046 | 0.026 | 0.021 | CNE58 | BC | 2.220 | 0.968 | >50 |
| QH0692.42 | B | 1.854 | 0.929 | 8.545 | MS208.A1 | A | >50 | >50 | >50 |
| SC422661.8 | B | 0.627 | 0.418 | 0.460 | Q23.17 | A | 0.030 | 0.021 | 0.031 |
| PVO.4 | B | 0.952 | 0.360 | 0.945 | Q461.e2 | A | >50 | >50 | >50 |
| TRO.11 | B | 0.081 | 0.057 | 0.051 | Q769.d22 | A | >50 | >50 | >50 |
| AC10.0.29 | B | 0.250 | 0.110 | 0.169 | Q259.d2.17 | A | >50 | >50 | >50 |
| RHPA4259.7 | B | 0.163 | 0.118 | 0.054 | Q842.d12 | A | >50 | >50 | 0.074 |
| THRO4156.18 | B | >50 | >50 | >50 | 3415.v1.c1 | A | >50 | >50 | >50 |
| REJO4541.67 | B | >50 | >50 | >50 | 3365.v2.c2 | A | 1.380 | 0.450 | 7.353 |
| TRJO4551.58 | B | 7.269 | 0.634 | 35.291 | 0260.v5.c36 | A | 0.436 | 0.160 | 0.152 |
| WITO4160.33 | B | 6.484 | 2.112 | 6.007 | 191955.A11 | A (T/F) | >50 | >50 | >50 |
| CAAN5342.A2 | B | 0.079 | 0.036 | 0.051 | 191084.B7-19 | A (T/F) | 0.144 | 0.128 | 0.128 |
| YU-2 | B | 0.891 | 0.398 | 0.356 | 9004SS.A3_4 | A (T/F) | 0.050 | 0.030 | 0.026 |
| WEAU_d15_410_787 | B (T/F) | 0.422 | 0.375 | 0.295 | T257-31 | CRF02_AG | >50 | >50 | >50 |
| 1006_11_C3_1601 | B (T/F) | 0.019 | 0.013 | 0.023 | 928-28 | CRF02_AG | 7.151 | 4.696 | >50 |
| 1054_07_TC4_1499 | B (T/F) | 0.901 | 0.563 | 0.696 | 263-8 | CRF02_AG | >50 | 6.527 | 24.576 |
| 1056_10_TA11_1826 | B (T/F) | 0.563 | 0.272 | 0.303 | T250-4 | CRF02_AG | 0.005 | 0.005 | 0.011 |
| 1012_11_TC21_3257 | B (T/F) | 0.111 | 0.059 | 0.038 | T251-18 | CRF02_AG | 7.399 | 7.395 | >50 |
| 6240_08_IA5_4622 | B (T/F) | 0.348 | 0.306 | 0.584 | T278-50 | CRF02_AG | >50 | 18.275 | >50 |
| 6244_13_B5_4576 | B (T/F) | 1.296 | 0.922 | 1.878 | T255-34 | CRF02_AG | >50 | >50 | >50 |
| 62357_14_D3_4589 | B (T/F) | >50 | >50 | 45.559 | 211-9 | CRF02_AG | 3.848 | 0.425 | 8.840 |
| SC05_8C11_2344 | B (T/F) | 0.174 | 0.123 | 0.275 | 235-47 | CRF02_AG | 0.381 | 0.163 | 1.676 |
| Du156.12 | C | 0.101 | 0.076 | 0.033 | 620345.c01 | CRF01_AE | >50 | >50 | >50 |
| Du172.17 | C | 0.607 | 0.430 | 0.890 | CNE8 | CRF01_AE | >50 | >50 | >50 |
| Du422.1 | C | 0.215 | 0.166 | 0.131 | C1080.c03 | CRF01_AE | >50 | >50 | >50 |
| ZM197M.PB7 | C | >50 | >50 | >50 | R2184.c04 | CRF01_AE | >50 | >50 | >50 |
| ZM214M.PL15 | C | 3.251 | 2.367 | 3.150 | R1166.c01 | CRF01_AE | >50 | >50 | >50 |
| ZM233M.PB6 | C | 4.524 | 0.349 | 8.977 | C2101.c01 | CRF01_AE | >50 | >50 | >50 |
| ZM249M.PL1 | C | >50 | >50 | >50 | C3347.c11 | CRF01_AE | >50 | >50 | >50 |
| ZM53M.PB12 | C | >50 | >50 | 0.002 | C4118.c09 | CRF01_AE | >50 | >50 | >50 |
| ZM109F.PB4 | C | >50 | >50 | >50 | CNE5 | CRF01_AE | >50 | >50 | >50 |
| ZM135M.PL10a | C | 0.553 | 0.367 | 5.885 | BJOX009000.02.4 | CRF01_AE | >50 | >50 | 37.289 |
| CAP45.2.00.G3 | C | >50 | >50 | 6.544 | BJOX015000.11.5 | CRF01_AE (T/F) | >50 | >50 | >50 |
| CAP210.2.00.E8 | C | >50 | >50 | >50 | BJOX010000.06.2 | CRF01_AE (T/F) | >50 | >50 | >50 |
| HIV-001428-2.42 | C | 0.204 | 0.261 | 0.156 | BJOX025000.01.1 | CRF01_AE (T/F) | >50 | >50 | >50 |
| HIV-0013095-2.11 | C | >50 | >50 | >50 | BJOX028000.10.3 | CRF01_AE (T/F) | >50 | >50 | >50 |
| HIV-16055-2.3 | C | >50 | >50 | 4.290 | X1193.c1 | G | 0.482 | 0.475 | 0.202 |
| HIV-16845-2.22 | C | 9.933 | 5.835 | >50 | P0402.c2_11 | G | 0.065 | 0.039 | 0.056 |
| Ce1086_B2 | C (T/F) | >50 | >50 | 0.006 | X1254.c3 | G | 0.420 | 0.297 | 0.199 |
| Ce0393_C3 | C (T/F) | >50 | >50 | >50 | X2088.c9 | G | 0.014 | 0.014 | 0.029 |
| Ce1176_A3 | C (T/F) | 0.151 | 0.070 | 0.058 | X2131.C1_B5 | G | 0.085 | 0.064 | 0.058 |
| Ce2010_F5 | C (T/F) | >50 | >50 | >50 | P1981.C5_3 | G | 0.018 | 0.017 | 0.015 |
| Ce0682_E4 | C (T/F) | >50 | >50 | >50 | X1632_S2_B10 | G | >50 | >50 | >50 |
| Ce1172_H1 | C (T/F) | 0.173 | 0.166 | 0.088 | 3018.v5.c45 | D | >50 | >50 | >50 |
| Ce2060_G9 | C (T/F) | >50 | >50 | >50 | A07412M1.vrc12 | D | 0.070 | 0.048 | 0.406 |
| Ce703010054_2A2 | C (T/F) | >50 | >50 | >50 | 231965.c01 | D | >50 | >50 | >50 |
| BF1266.431a | C (T/F) | >50 | >50 | >50 | 231966.c02 | D | >50 | >50 | >50 |
| 246F.C1G | C (T/F) | 0.270 | 0.111 | 0.287 | 191821.E6_1 | D (T/F) | >50 | >50 | >50 |
| 249M.B10 | C (T/F) | >50 | >50 | >50 | 3817.v2.c59 | CD | 34.619 | 14.880 | >50 |
| ZM247v1(Rev-) | C (T/F) | 0.252 | 0.166 | 0.126 | 6480.v4.c25 | CD | 0.049 | 0.041 | 0.079 |
| 7030102001E5(Rev-) | C (T/F) | 0.044 | 0.021 | 0.043 | 6952.v1.c20 | CD | 0.188 | 0.138 | 0.605 |
| 1394C9G1(Rev-) | C (T/F) | 0.328 | 0.191 | 3.372 | 6811.v7.c18 | CD | 0.011 | 0.010 | 0.017 |
| Ce704809221_1B3 | C (T/F) | 1.208 | 0.696 | 0.492 | 89-F1_2_25 | CD | >50 | >50 | >50 |
| CNE19 | BC | >50 | >50 | 0.189 | 3301.v1.c24 | AC | 0.054 | 0.042 | 0.043 |
| CNE20 | BC | 0.000 | 0.005 | 0.008 | 6041.v3.c23 | AC | >50 | >50 | >50 |
| CNE21 | BC | 0.255 | 0.181 | 0.061 | 6540.v4.c1 | AC | >50 | >50 | >50 |
| CNE17 | BC | 24.701 | 13.297 | >50 | 6545.v4.c1 | AC | >50 | >50 | >50 |
| CNE30 | BC | 1.989 | 1.200 | 0.559 | 0815.v3.c3 | ACD | 0.251 | 0.138 | 0.105 |
| CNE52 | BC | 43.834 | 13.147 | 32.935 | 3103.v3.c10 | ACD | 0.150 | 0.101 | 0.110 |
| CNE53 | BC | 0.233 | 0.141 | 0.200 | | | | | |

Цифрами указаны концентрации IgG-антител в мкг/мл для достижения IC80 в анализе нейтрализации TZM-bl. Значения IC80 кодированы цветом, и возрастающая чувствительность к нейтрализации указана от темно-зеленого до темно-красного цвета. > показывает, что IC80 для данного вируса не была достигнута при тестируемой концентрации.

Чувствительность к нейтрализации в соответствии с N332-PNGS

| ID Вируса | Клада | N332 PNGS | | | 10-996 | | | 10-1074 | | | PGT121 | | |
|--------------------|----------------|-----------|------|--------|---------|--------|------|---------|--------|---------|--------|--|--|
| | | N332 | S334 | 10-996 | 10-1074 | PGT121 | N332 | S334 | 10-996 | 10-1074 | PGT121 | | |
| 6535.3 | B | . | . | | | | | | | | | | |
| QH0692.42 | B | . | . | | | | | | | | | | |
| SC422661.8 | B | . | . | | | | | | | | | | |
| PVO.4 | B | . | . | | | | | | | | | | |
| TRO.11 | B | . | . | | | | | | | | | | |
| AC10.0.29 | B | . | . | | | | | | | | | | |
| RHPA4259.7 | B | . | . | | | | | | | | | | |
| THRO4156.18 | B | T | N | | | | | | | | | | |
| REJO4541.67 | B | T | N | | | | | | | | | | |
| TRJO4551.58 | B | . | . | | | | | | | | | | |
| WITO4160.33 | B | . | . | | | | | | | | | | |
| CAAN5342.A2 | B | . | . | | | | | | | | | | |
| YU-2 | B | . | . | | | | | | | | | | |
| WEAU_d15_410_787 | B (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| 1006_11_C3_1601 | B (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| 1054_07_TC4_1499 | B (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| 1056_10_TA11_1826 | B (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| 1012_11_TC21_3257 | B (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| 6240_08_TA5_4622 | B (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| 6244_13_B5_4576 | B (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| 62357_14_D3_4589 | B (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| SC05_8C11_2344 | B (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| Du156.12 | C | . | . | | | | | | | | | | |
| Du172.17 | C | . | . | | | | | | | | | | |
| Du422.1 | C | . | . | | | | | | | | | | |
| ZM197M.PB7 | C | D | . | | | | | | | | | | |
| ZM214M.PL15 | C | . | . | | | | | | | | | | |
| ZM233M.PB6 | C | . | . | | | | | | | | | | |
| ZM249M.PL1 | C | . | . | | | | | | | | | | |
| ZM53M.PB12 | C | I | N | | | | | | | | | | |
| ZM109F.PB4 | C | K | N | | | | | | | | | | |
| ZM135M.PL10a | C | . | . | | | | | | | | | | |
| CAP45.2.00.G3 | C | . | N | | | | | | | | | | |
| CAP210.2.00.E8 | C | . | . | | | | | | | | | | |
| HIV-001428-2.42 | C | . | . | | | | | | | | | | |
| HIV-0013095-2.11 | C | . | . | | | | | | | | | | |
| HIV-16065-2.3 | C | . | K | | | | | | | | | | |
| HIV-16845-2.22 | C | . | . | | | | | | | | | | |
| Ce1086_B2 | C (T/F) | . | N | | | | | | | | | | |
| Ce0393_C3 | C (T/F) | . | D | | | | | | | | | | |
| Ce1176_A3 | C (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| Ce2010_F5 | C (T/F) | T | N | | | | | | | | | | |
| Ce0682_E4 | C (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| Ce1172_H1 | C (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| Ce2060_G9 | C (T/F) | . | (T) | | | | | | | | | | |
| Ce703010054_2A2 | C (T/F) | D | N | | | | | | | | | | |
| BF1266.431a | C (T/F) | T | N | | | | | | | | | | |
| 246F C1G | C (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| 249M B10 | C (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| ZM247v1(Rev-) | C (T/F) | . | (T) | | | | | | | | | | |
| 7030102001E5(Rev-) | C (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| 1394C9G1(Rev-) | C (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| Ce704809221_1B3 | C (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| CNE19 | BC | . | . | | | | | | | | | | |
| CNE20 | BC | . | . | | | | | | | | | | |
| CNE21 | BC | . | . | | | | | | | | | | |
| CNE17 | BC | . | . | | | | | | | | | | |
| CNE30 | BC | . | . | | | | | | | | | | |
| CNE52 | BC | . | . | | | | | | | | | | |
| CNE53 | BC | . | . | | | | | | | | | | |
| CNE58 | BC | . | (T) | | | | | | | | | | |
| MS208.A1 | A | . | . | | | | | | | | | | |
| Q23.17 | A | . | (T) | | | | | | | | | | |
| Q461.e2 | A | V | N | | | | | | | | | | |
| Q769.d22 | A | . | N | | | | | | | | | | |
| Q259.d2.17 | A | T | N | | | | | | | | | | |
| Q842.d12 | A | . | N | | | | | | | | | | |
| 3415.v1.c1 | A | . | . | | | | | | | | | | |
| 3365.v2.c2 | A | . | . | | | | | | | | | | |
| 0260.v5.c36 | A | . | . | | | | | | | | | | |
| 191955_A11 | A (T/F) | K | N | | | | | | | | | | |
| 191084 B7-19 | A (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| 9004SS_A3_4 | A (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| T257-31 | CRF02_AG | K | N | | | | | | | | | | |
| 928-28 | CRF02_AG | . | . | | | | | | | | | | |
| 263-8 | CRF02_AG | . | . | | | | | | | | | | |
| T250-4 | CRF02_AG | . | . | | | | | | | | | | |
| T251-18 | CRF02_AG | . | . | | | | | | | | | | |
| T278-50 | CRF02_AG | . | . | | | | | | | | | | |
| T255-34 | CRF02_AG | . | . | | | | | | | | | | |
| 211-9 | CRF02_AG | . | . | | | | | | | | | | |
| 235-47 | CRF02_AG | . | . | | | | | | | | | | |
| 620345.c01 | CRF01_AE | E | N | | | | | | | | | | |
| CNE8 | CRF01_AE | E | N | | | | | | | | | | |
| C1080.c03 | CRF01_AE | E | N | | | | | | | | | | |
| R2184.c04 | CRF01_AE | V | N | | | | | | | | | | |
| R1166.c01 | CRF01_AE | E | N | | | | | | | | | | |
| C2101.c01 | CRF01_AE | E | N | | | | | | | | | | |
| C3347.c11 | CRF01_AE | E | N | | | | | | | | | | |
| C4118.c09 | CRF01_AE | E | D | | | | | | | | | | |
| CNE5 | CRF01_AE | E | N | | | | | | | | | | |
| BJOX009000.02.4 | CRF01_AE | E | N | | | | | | | | | | |
| BJOX015000.11.5 | CRF01_AE (T/F) | E | N | | | | | | | | | | |
| BJOX010000.06.2 | CRF01_AE (T/F) | K | N | | | | | | | | | | |
| BJOX025000.01.1 | CRF01_AE (T/F) | E | N | | | | | | | | | | |
| BJOX028000.10.3 | CRF01_AE (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| X1193_c1 | G | . | . | | | | | | | | | | |
| P0402_c2_11 | G | . | . | | | | | | | | | | |
| X1254_c3 | G | . | . | | | | | | | | | | |
| X2088_c9 | G | . | (T) | | | | | | | | | | |
| X2131_C1_B5 | G | . | . | | | | | | | | | | |
| P1981_C5_3 | G | . | . | | | | | | | | | | |
| X1632_S2_B10 | G | . | N | | | | | | | | | | |
| 3016.v5.c45 | D | T | D | | | | | | | | | | |
| A07412M1.vrc12 | D | . | . | | | | | | | | | | |
| 231965.c01 | D | . | . | | | | | | | | | | |
| 231966.c02 | D | . | . | | | | | | | | | | |
| 191821_E6_1 | D (T/F) | . | . | | | | | | | | | | |
| 3817.v2.c59 | CD | . | . | | | | | | | | | | |
| 6480.v4.c25 | CD | . | . | | | | | | | | | | |
| 6952.v1.c20 | CD | . | . | | | | | | | | | | |
| 6811.v7.c18 | CD | . | . | | | | | | | | | | |
| 89-F1_2_25 | CD | T | . | | | | | | | | | | |
| 3301.v1.c24 | AC | . | (T) | | | | | | | | | | |
| 6041.v3.c23 | AC | D | N | | | | | | | | | | |
| 6540.v4.c1 | AC | T | N | | | | | | | | | | |
| 6545.v4.c1 | AC | T | N | | | | | | | | | | |
| 0815.v3.c3 | ACD | . | . | | | | | | | | | | |
| 3103.v3.c10 | ACD | . | . | | | | | | | | | | |

Точками указано присутствие остатка аспарагина и остатка серина в положениях 332 и 334, соответственно. Мутации в положениях 332 и 334 (нумерации последовательности HXB2N) указаны заменой аминокислоты. Значения IC50 кодированы цветом, и возрастающая чувствительность к нейтрализации в анализе TZM-bl.

Таблица 8

Основанный на PBMC анализ нейтрализации in vitro

| ID вируса | ZBNC55 | ZBNC60 | ZBNC117 | BANC134 | INC9 | 45-46 | BANC195 | 12A12 | 4E10 | b12 | ZG12 | ZF5 | PG9 | PG16 | VRC01 | 45-46 54W | PGT121 | 10-1074 |
|---------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------|---------|---------|
| R035.6.E4 | 1.918 | 0.023 | <0.0032 | 0.034 | 0.451 | 0.037 | >50 | 0.110 | 1.043 | 11.885 | <0.39 | 3.480 | >1 | >1 | <0.078 | 0.032 | 15.471 | 0.058 |
| R035.6.H11 | 0.550 | 0.029 | 0.022 | 0.239 | 0.031 | 0.053 | >50 | 0.130 | 2.941 | 10.756 | <0.39 | 2.115 | >1 | >1 | 0.180 | 0.018 | 0.667 | 0.143 |
| R035.6.D10 | >50 | >50 | 0.019 | >50 | 0.245 | <0.0032 | >50 | <0.0032 | 0.792 | >12.5 | <0.39 | 1.900 | >1 | >1 | 0.390 | 0.020 | 0.174 | 0.110 |
| P151.37.C7 | 0.084 | 0.038 | 0.093 | 0.126 | 0.018 | 0.016 | 0.133 | 0.402 | 2.941 | 1.882 | >25 | 3.350 | <0.016 | <0.016 | <0.078 | 0.109 | >50 | >50 |
| P151.37.F1 | 1.297 | 0.125 | 0.181 | 1.633 | 1.288 | 0.203 | 0.136 | 18.043 | 0.860 | >12.5 | >25 | 1.372 | <0.016 | <0.016 | 0.250 | 0.472 | >50 | >50 |
| P151.37.F10 | 3.770 | 0.311 | 0.249 | 4.681 | >50 | 0.375 | >50 | 18.663 | 9.314 | 0.452 | >25 | <0.39 | <0.016 | <0.016 | 1.160 | 0.172 | >50 | >50 |
| P153.10.2.A9 | 19.804 | 0.763 | 0.861 | 17.208 | 46.735 | 0.039 | 0.201 | >50 | 12.289 | 7.988 | 0.825 | 0.918 | >1 | 0.431 | >5 | 34.912 | 42.623 | 1.466 |
| P153.10.2.D8 | 20.569 | 1.020 | 0.208 | 23.124 | >50 | 0.039 | >50 | 2.478 | 0.861 | >12.5 | 3.562 | 24.193 | >1 | 0.853 | 0.890 | 0.325 | 1.603 | 0.200 |
| P153.10.2.E10 | 11.226 | 0.546 | 0.211 | 2.105 | >50 | 0.103 | >50 | 10.688 | 0.792 | 9.212 | <0.39 | 22.362 | >1 | <0.016 | >5 | >50 | >50 | >50 |
| P186.12.1.D10 | 0.061 | 0.061 | 0.105 | >50 | 0.075 | 0.185 | 0.091 | 7.289 | >25 | 9.333 | >25 | 2.492 | >1 | >1 | >5 | 22.665 | 0.021 | 0.212 |
| P186.12.2.F4 | >50 | >50 | >50 | >50 | >50 | >50 | >50 | >50 | 4.903 | 11.075 | >25 | 15.277 | >1 | >1 | 3.320 | 15.929 | 0.025 | 0.094 |
| P186.12.2.G2 | 1.890 | <0.0032 | <0.0032 | >50 | 0.048 | 0.047 | >50 | 0.068 | 15.711 | 10.783 | 21.986 | 3.181 | >1 | >1 | >5 | 16.385 | 0.018 | 0.108 |
| P195.31.A6 | 0.032 | 0.138 | <0.0032 | 0.171 | 0.228 | 0.052 | 0.099 | 0.205 | 2.934 | 0.498 | >25 | 3.884 | >1 | >1 | 0.890 | >50 | >50 | >50 |
| P195.31.A10 | 0.252 | 0.024 | 0.025 | >50 | 0.953 | 0.050 | 0.471 | >50 | 1.248 | 8.986 | >25 | <0.39 | >1 | >1 | 4.800 | >50 | >50 | >50 |
| P195.31.F11 | 0.589 | 0.084 | 0.137 | >50 | >50 | 0.078 | >50 | 33.131 | 2.301 | >12.5 | >25 | 2.306 | >1 | >1 | 1.930 | >50 | >50 | >50 |
| P019.1.D2 | 0.949 | 0.164 | 0.027 | >50 | >50 | 0.057 | >50 | 14.612 | >25 | 0.432 | <0.39 | <0.39 | <0.016 | <0.016 | 0.220 | 0.051 | >50 | 0.191 |
| P019.1.D6 | 3.122 | 0.738 | 0.635 | >50 | >50 | 5.767 | >50 | >50 | 2.443 | >12.5 | 9.371 | <0.39 | <0.016 | <0.016 | <0.078 | 0.043 | 0.025 | 0.528 |
| P019.1.G7 | 6.034 | 3.836 | 4.570 | >50 | >50 | 6.962 | >50 | 20.092 | 1.073 | >12.5 | 8.764 | <0.39 | 0.050 | 0.034 | <0.078 | <0.0032 | >50 | 0.318 |
| P175.10.D7 | 2.539 | 0.936 | 3.588 | >50 | 42.695 | 17.723 | >50 | 36.805 | 1.487 | 1.369 | <0.39 | >25 | >1 | 0.110 | 1.100 | 0.022 | 0.068 | 0.097 |
| P175.10.D12 | 0.708 | 0.410 | 0.057 | >50 | 0.317 | 0.175 | 1.233 | 10.648 | 0.953 | >12.5 | <0.39 | >25 | >1 | 0.150 | 0.170 | 0.032 | 0.083 | 0.241 |
| P175.10.G10 | 2.506 | 0.563 | 0.621 | >50 | 33.008 | 8.994 | 22.413 | 18.554 | 1.147 | >12.5 | 2.183 | 1.300 | 0.720 | 0.032 | 1.660 | 0.017 | 0.069 | 0.220 |
| P013.18.A9 | 0.125 | 0.762 | 0.079 | >50 | 0.198 | 0.018 | 0.428 | 0.205 | 0.796 | >12.5 | >25 | 2.783 | >1 | >1 | >5 | 0.083 | 5.844 | >50 |
| P154.44.C8 | >50 | 0.683 | 1.042 | >50 | >50 | 16.440 | 0.925 | >50 | >25 | >12.5 | >25 | >25 | >1 | >1 | >5 | >50 | >50 | >50 |
| P154.44.G3 | >50 | 1.220 | 2.172 | >50 | >50 | 25.616 | 1.969 | >50 | 4.450 | >12.5 | >25 | >25 | <0.016 | >1 | 0.790 | 0.536 | 1.986 | 0.521 |
| P183.50.2.H3 | 2.197 | 0.116 | 0.121 | 12.049 | 4.079 | 0.181 | >50 | 0.476 | 3.890 | 5.923 | 6.686 | 1.527 | >1 | >1 | 1.031 | 0.185 | 2.106 | 0.185 |
| P183.3.2.B9 | 0.076 | 0.025 | <0.0032 | 0.053 | 0.326 | 0.142 | >50 | 0.472 | 1.722 | 1.230 | 2.132 | 1.073 | >1 | >1 | 0.340 | 0.056 | 5.073 | 0.266 |
| P001.35.F5 | 0.418 | 0.048 | 0.047 | 8.133 | 0.329 | 0.133 | >50 | 0.187 | <0.39 | >12.5 | >25 | >25 | <0.016 | <0.016 | >5 | 0.946 | 1.873 | 0.464 |
| P001.35.H4 | 2.180 | 0.333 | 1.919 | >50 | >50 | 6.118 | >50 | >50 | 0.830 | >12.5 | >25 | >25 | <0.016 | <0.016 | 4.300 | 0.051 | 2.648 | 0.052 |
| P002.39.C8 | 15.016 | 0.117 | 0.172 | 2.192 | 12.154 | 0.546 | >50 | >50 | 1.955 | >12.5 | 2.216 | >25 | <0.016 | <0.016 | <0.078 | 0.450 | 1.129 | 0.024 |
| P002.39.F8 | >50 | 28.891 | >50 | 13.090 | >50 | 0.404 | >50 | >50 | 0.884 | >12.5 | <0.39 | 17.778 | <0.016 | <0.016 | 1.610 | 0.625 | 22.125 | 0.049 |
| P002.39.H10 | 1.472 | 0.785 | 0.726 | 14.180 | 0.147 | 0.072 | >50 | >50 | 1.530 | >12.5 | <0.39 | 1.500 | <0.016 | 0.448 | 3.030 | 0.917 | 1.985 | 0.042 |
| P034.6.D6 | 37.003 | 0.161 | 0.176 | 11.339 | 1.137 | 0.235 | >50 | 0.802 | 1.164 | 11.122 | 0.844 | 0.873 | 0.081 | 0.027 | <0.078 | 0.859 | 0.027 | <0.0032 |
| P034.6.G10 | 48.817 | 0.348 | 0.237 | 22.481 | 1.428 | 0.012 | >50 | 0.188 | 0.820 | 8.598 | <0.39 | 1.257 | >1 | >1 | >5 | >50 | >50 | 0.028 |
| P034.6.H5 | >50 | 0.417 | 0.267 | 20.730 | 0.820 | 0.245 | >50 | 0.885 | 0.391 | >12.5 | >25 | 1.183 | 0.017 | 0.021 | 0.310 | 0.127 | 0.057 | 0.118 |
| P101.20.1.F1 | >50 | >50 | >50 | >50 | >50 | 0.585 | >50 | 0.634 | 3.999 | >12.5 | >25 | 2.721 | >1 | >1 | 2.420 | 0.676 | <0.0032 | <0.0032 |
| P101.20.1.H8 | >50 | >50 | >50 | >50 | >50 | 0.090 | >50 | 0.474 | 0.902 | >12.5 | >25 | 1.719 | >1 | >1 | 1.470 | 0.861 | <0.0032 | <0.0032 |
| P127.46.A6 | >50 | >50 | >50 | >50 | >50 | 0.386 | >50 | 0.668 | 1.211 | 8.780 | 2.345 | 1.671 | 0.079 | <0.016 | <0.078 | 0.143 | >50 | >50 |
| P127.46.D1 | 1.242 | 0.024 | 0.040 | 5.403 | 2.558 | 0.169 | >50 | 0.227 | 1.092 | >12.5 | <0.39 | 0.921 | 0.101 | 0.150 | 0.230 | 0.293 | >50 | >50 |
| P127.46.D2 | 1.125 | 0.173 | 0.221 | >50 | 2.231 | 0.279 | >50 | 0.494 | 1.613 | <0.195 | >25 | 1.126 | 0.378 | <0.016 | <0.078 | 0.023 | >50 | >50 |
| P174.28.E11 | 2.399 | 0.483 | 0.716 | >50 | 13.061 | 0.894 | >50 | 2.104 | 2.113 | 8.149 | 0.974 | 1.674 | 0.023 | <0.016 | 3.910 | 1.863 | 0.085 | 0.650 |
| P177.25.1.G9 | 0.980 | 0.191 | 0.189 | >50 | 1.826 | 0.261 | >50 | 0.130 | 1.665 | >12.5 | >25 | 5.851 | >1 | >1 | <0.078 | 0.325 | 0.125 | 0.034 |
| P177.25.2.B4 | 1.179 | 0.080 | 0.641 | 23.609 | 0.384 | 0.150 | >50 | 0.028 | 3.729 | >12.5 | >25 | 1.241 | >1 | >1 | 0.450 | 0.530 | 0.029 | 0.029 |
| P177.25.2.D1 | >50 | 1.949 | 1.359 | >50 | 48.825 | 11.454 | >50 | 7.681 | 1.140 | 7.770 | >25 | 1.232 | >1 | >1 | 3.330 | 0.058 | 0.017 | 0.019 |
| P180.14.A6 | 1.389 | 0.098 | 0.058 | 0.017 | >50 | 0.024 | >50 | 0.192 | 1.162 | >12.5 | 17.668 | >25 | 0.036 | <0.016 | 1.000 | 2.094 | 0.139 | 0.029 |
| P180.14.G6 | 45.246 | 0.116 | 0.122 | 2.449 | 13.361 | 0.169 | 0.220 | 0.693 | 4.009 | >12.5 | 2.988 | >25 | <0.016 | <0.016 | 2.360 | 0.306 | 0.174 | 0.029 |
| P180.14.G7 | 23.444 | 0.082 | 0.035 | 0.022 | 1.450 | 0.024 | 0.703 | 0.729 | 15.758 | >12.5 | 2.400 | >25 | <0.016 | <0.016 | 1.240 | 1.012 | 0.028 | 0.038 |
| P197.25.1.D2 | >50 | 0.285 | 0.194 | 1.480 | 1.137 | 0.016 | 0.028 | 0.072 | 1.492 | >12.5 | >12.5 | 1.224 | <0.016 | <0.016 | 0.090 | 0.025 | 14.287 | 0.095 |
| P197.25.1.D7 | >50 | 0.782 | 0.019 | 0.052 | 7.056 | 0.051 | 0.016 | 2.601 | 0.948 | >12.5 | 1.232 | 1.291 | <0.016 | <0.016 | <0.078 | 0.052 | 20.337 | 0.052 |
| P197.25.1.H1 | >50 | 0.017 | 0.019 | <0.0032 | <0.0032 | 0.029 | <0.0032 | 7.854 | 2.515 | >12.5 | 1.079 | 2.088 | <0.016 | <0.016 | <0.078 | 0.072 | 23.417 | 0.915 |
| P405.18.D3 | 0.086 | <0.0032 | 0.029 | 0.095 | 0.045 | 0.022 | 0.022 | 0.031 | 0.924 | 0.471 | <0.39 | 1.137 | >1 | >1 | >5 | 0.254 | 0.011 | 0.018 |
| P405.18.F10 | 0.935 | 0.063 | 0.084 | 5.648 | 0.432 | 0.094 | 0.126 | 0.469 | 1.350 | 0.718 | <0.39 | 0.804 | ND | ND | >5 | >50 | 5.680 | >50 |
| P405.18.H6 | 4.725 | 0.219 | 0.782 | 1.100 | 19.220 | 0.027 | 0.450 | 43.884 | 1.328 | 0.497 | 0.986 | 0.815 | 0.141 | <0.016 | >5 | >50 | 4.760 | 0.187 |
| P405.19.A8 | 0.291 | 0.021 | <0.0032 | 0.116 | 0.278 | 0.059 | 0.110 | 0.037 | 2.012 | 1.116 | 0.814 | 0.878 | >1 | 0.044 | 0.470 | 0.031 | 0.917 | <0.0032 |
| P405.19.B12 | 0.889 | 0.057 | 0.095 | 0.264 | 1.103 | 0.033 | 0.233 | 0.157 | 0.807 | 0.855 | 0.968 | 1.029 | 0.190 | <0.016 | >5 | <0.0032 | <0.0032 | <0.0032 |
| P405.19.F11 | 0.688 | 0.018 | 0.109 | 2.892 | 2.131 | 0.037 | >50 | 5.279 | 0.818 | 0.413 | <0.39 | 3.630 | 0.190 | 0.034 | | | | |

Цифрами указаны концентрации IgG-антител в мкг/мл для достижения IC50 в анализе нейтрализации на основе РВМС. Значения IC50 кодированы цветом, и возрастающая чувствительность к нейтрализации указана от темно-зеленого до темно-красного цвета. > показывает, что IC50 для данного вируса не была достигнута при тестируемой концентрации. ND - не определяли

Таблица 9

| Сбор данных и статистика уточнения (молекулярное замещение) | | | | |
|---|---|-------------------------|------------------------|---|
| | PGT121 Fab «не связанный с лигандом» | 10-1074 Fab | GL Fab | PGT121 Fab «связанный с лигандом» |
| Сбор данных | | | | |
| Пространственная группа | P2 ₁ ,2 ₁ ,2 ₁ | P2 ₁ | P2 ₁ | P2 ₁ ,2 ₁ ,2 ₁ |
| Размеры элементарной ячейки a, b, c (Å) | 56.75, 74.67, 114.917 | 61.38, 40.26, 84.46 | 54.93, 344.74, 55.23 | 67.79, 67.79, 94.11 |
| α, β, γ (°) | 90.00, 90.00, 90.00 | 90.00, 95.39, 90.00 | 90.00, 91.95, 90.00 | 90.00, 90.00, 90.00 |
| Разрешение (Å) | 2.78-35.5 (2.78-2.93) | 1.80- 36.31 (1.80-1.91) | 2.42-38.60 (2.42-2.55) | 2.33-38.66 (2.33-2.47) |
| R _{merge} | 0.099 (0.293) | 0.075 (0.558) | 0.072 (0.482) | 0.161 (0.603) |
| I / σ _i | 8.8 (3.1) | 8.7 (1.8) | 11.0 (1.9) | 8.7 (2.9) |
| Полнота (%) | 96.7 (84.8) | 93.49 (98.0) | 95.5 (80.1) | 92.2 (98.9) |
| Избыточность | 3.2 (2.7) | 2.7 (2.8) | 3.1 (2.6) | 5.3 (5.8) |
| Уточнение | | | | |
| Разрешение (Å) | 3.0 | 1.9 | 2.42 | 2.4 |
| Количество отражения | 10,076 | 31,363 | 74,237 | 16,831 |
| R _{work} / R _{free} | 0.216/0.264 | 0.187/0.223 | 0.194/0.237 | 0.201/0.249 |
| Количество атомов | | | | |
| Белок | 3,276 | 3,346 | 12,881 | 3,127 |
| Лиганд/ион | 0 | 0 | 0 | 129 |
| Вода | 0 | 300 | 527 | 203 |
| B- фактор | | | | |
| Белок | 32.78 | 29.17 | 44.67 | 31.48 |
| Лиганд/ион | - | - | - | 45.1 |
| Вода | - | 37.37 | 40.27 | 36.78 |
| Средние квадратичные отклонения | | | | |
| Длины связей (Å) | 0.005 | 0.007 | 0.005 | 0.006 |
| Углы связей (°) | 0.971 | 1.234 | 0.951 | 0.949 |

* Данные для каждой структуры получали на основании одного кристалла

* Значения в скобках приведены для оболочки с наибольшим разрешением

Таблица 10

| Значения RMSD для Cα выравниваний Fab | | | | | | |
|---|------------------------|---------------------|------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|
| Fab1/Fab2 | RMSD _{vh} (Å) | количество остатков | RMSD _{vl} (Å) | количество остатков | RMSD _{vh+vl} (Å) | количество остатков |
| PGT121/PGT128 | 1.159 | 116/130 | 1.63 | 95/100 | 1.462 | 207/235 |
| PGT121/PGT145 | 2.93 | 124/130 | 1.91 | 94/105 | 1.75 | 206/235 |
| PGT121/10-1074 | 0.74 | 128/130 | 1.2 | 102/105 | 1.26 | 226/235 |
| PGT121/GL | 1.33 | 129/130 | 1.37 | 94/105 | 1.6 | 225/235 |
| 10-1074/GL | 1.38 | 130/130 | 1.35 | 92/105 | 1.39 | 220/235 |
| PGT121/PGT128 <small>связанный с лигандом</small> | 0.79 | 125/128 | 0.5 | 100/100 | 0.78 | 225/228 |

Таблица 11

Контакты между Fab PGT121 и связанным гликаном

| Атом гликана | Атом белка | Вода | Расстояние(Å) | Атом гликана | Атом белка | Вода | Расстояние(Å) |
|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------|
| GlcNAc ⁶ -O3 | Asn ⁵⁸ -Nδ2 | | 2.91 | Sia ¹⁰ -O8 | Asp ³¹ -O | | 2.72 |
| GlcNAc ⁶ -O7 | Asn ⁵⁸ -Oδ1 | | 2.94 | Sia ¹⁰ -O10 | His ⁹⁷ -N | | 3.18 |
| GlcNAc ⁶ -O6 | | H ₂ O ⁴⁷¹ | 3.15 | Sia ¹⁰ -O10 | His ⁹⁷ -O | | 3.19 |
| GlcNAc ⁶ -O4 | | H ₂ O ⁴⁷⁷ | 3.05 | Sia ¹⁰ -O9 | | H ₂ O ⁴⁸⁰ | 3.19 |
| GlcNAc ⁶ -O3 | | H ₂ O ⁴⁸¹ | 2.94 | Sia ¹⁰ -O8 | Ser ³² -Oγ | | 3.70* |
| Man ¹ -O4 | | H ₂ O ⁴¹⁰ | 3.02 | Man ³ -O3 | Asn ⁵⁸ -Oδ1 | | 2.58 |
| Man ¹ -O4 | | H ₂ O ⁴²⁰ | 2.66 | Man ³ -O6 | | H ₂ O ⁴⁷⁷ | 3.35 |
| Man ¹ -O3 | | H ₂ O ⁴¹⁰ | 3.35 | GlcNAc ⁴ -O5 | Thr ⁵⁷ -O | | 3.33 |
| Man ¹ -O2 | | H ₂ O ⁴⁷⁷ | 3.14 | GlcNAc ⁴ -N2 | | H ₂ O ⁴⁷⁹ | 3.2 |
| Man ¹ -O5 | | H ₂ O ⁴⁷⁷ | 2.62 | Fuc ⁹ -O2 | | H ₂ O ⁴⁷¹ | 2.57 |
| Man ² -O6 | Thr ¹⁰⁰ -Oγ1 | | 3.34 | | Asp ³¹ -O | H ₂ O ⁴³⁵ | 3.09 |
| Man ² -O2 | | H ₂ O ⁴¹⁰ | 3.41 | | Asp ³¹ -Oδ1 | H ₂ O ⁴⁸⁰ | 3.32 |
| Man ² -O5 | | H ₂ O ⁴⁴⁶ | 2.95 | | Tyr ⁵⁰ -OH | H ₂ O ⁴⁸¹ | 2.8 |
| Man ² -O6 | | H ₂ O ⁴⁴⁶ | 3.26 | | His ⁵² -Ne2 | H ₂ O ⁴³⁵ | 3.16 |
| GlcNAc ⁷ -N2 | Tyr ³³ -OH | | 2.72 | | Ser ⁵⁴ -Oγ | H ₂ O ⁴¹⁰ | 3.2 |
| GlcNAc ⁷ -O5 | | H ₂ O ⁴¹⁰ | 3.38 | | Ser ⁵⁴ -O | H ₂ O ⁴²⁰ | 3.16 |
| GlcNAc ⁷ -O7 | | H ₂ O ⁴¹¹ | 3.00 | | Gly ⁵⁵ -O | H ₂ O ⁴⁷⁹ | 2.85 |
| GlcNAc ⁷ -O3 | His ⁹⁷ -Nδ2 | | 3.60* | | Asp ⁵⁶ -Oδ1 | H ₂ O ⁴⁸¹ | 3.49 |
| GlcNAc ⁷ -O7 | His ⁹⁷ -Ne2 | | 3.70* | | Asp ⁵⁶ -Oδ2 | H ₂ O ⁴⁴⁶ | 3.07 |
| Gal ⁸ -O3 | Lys ⁵³ -Nζ | | 2.97 | | Asn ⁵⁸ -Nδ2 | H ₂ O ⁴⁸¹ | 3.15 |
| Gal ⁸ -O4 | | H ₂ O ⁴⁸⁰ | 3.47 | | Arg ³⁹ -Nε | H ₂ O ⁴¹¹ | 2.58 |
| Gal ⁸ -O4 | | H ₂ O ⁴³⁵ | 2.76 | | Thr ¹⁰⁰ -Oγ1 | H ₂ O ⁴¹¹ | 2.94 |
| Gal ⁸ -O5 | | H ₂ O ⁴³⁵ | 3.17 | | | | |

критерии водородных связей: расстояние связи < 3.5 Å, O-H-O/N-H-O угол > 90°

* Контакты близки к пределу отсечения расстояния для водородной связи и включены как возможные взаимодействия

Таблица 12

| Нейтрализующая активность PGT121 _{GM} и 10-1074 _{GM} in vitro | | | | | |
|---|----------|--------|----------------------|---------|-----------------------|
| Вирус ID | Клада | PGT121 | PGT121 _{GM} | 10-1074 | 10-1074 _{GM} |
| Q842.d12 | A | 0.074 | >50 | >50 | >50 |
| 3365.v2.c2 | A | 7.353 | >50 | 0.450 | 0.467 |
| 0260.v5.c36 | A | 0.152 | >50 | 0.160 | 0.618 |
| YU.2 | B | 0.356 | 1.355 | 0.398 | 0.262 |
| TRO.11 | B | 0.051 | 0.258 | 0.057 | 0.049 |
| TRJO4551.58 | B | 35.291 | >50 | 0.634 | 0.721 |
| QH0692.42 | B | 8.545 | >50 | 0.929 | 0.376 |
| PVO.4 | B | 0.945 | 47.564 | 0.360 | 0.138 |
| RHPA4259.7 | B | 0.054 | 20.801 | 0.118 | 0.087 |
| WITO4160.33 | B | 6.007 | >50 | 2.112 | 0.406 |
| 1054_07_TC4_1499 | B (T/F) | 0.696 | >50 | 0.563 | 0.193 |
| 6244_13_B5_4576 | B (T/F) | 1.878 | 46.680 | 0.922 | 0.394 |
| 62357_14_D3_4589 | B (T/F) | 45.559 | >50 | >50 | 40.782 |
| CNE19 | BC | 0.189 | 48.092 | 50 | 0.379 |
| CNE17 | BC | >50 | >50 | 13.297 | 4.816 |
| CNE58 | BC | >50 | >50 | 0.968 | 1.158 |
| CNE30 | BC | 0.559 | 8.401 | 1.200 | 1.045 |
| CNE52 | BC | 32.935 | >50 | 13.147 | 6.664 |
| ZM233M.PB6 | C | 8.977 | >50 | 0.349 | 0.232 |
| ZM53M.PB12 | C | 0.002 | >50 | >50 | >50 |
| CAP45.2.00.G3 | C | 6.544 | >50 | >50 | >50 |
| HIV-16055-2.3 | C | 4.290 | >50 | >50 | >50 |
| HIV-16845-2.22 | C | >50 | >50 | 5.835 | 2.678 |
| ZM214M.PL15 | C | 3.150 | >50 | 2.367 | 0.200 |
| ZM135M.PL10a | C | 5.885 | >50 | 0.367 | 0.184 |
| Ce1086_B2 | C (T/F) | 0.006 | >50 | >50 | >50 |
| Ce1172_H1 | C (T/F) | 0.088 | 0.180 | 0.166 | 0.054 |
| 1394C9G1(Rev-) | C (T/F) | 3.372 | 2.120 | 0.191 | 0.075 |
| 3817.v2.c59 | CD | >50 | >50 | 14.880 | 3.423 |
| 6952.v1.c20 | CD | 0.605 | >50 | 0.138 | 0.134 |
| BJOX009000.02.4 | CRF01_AE | 37.289 | >50 | >50 | >50 |
| 211-9 | CRF02_AG | 8.840 | >50 | 0.425 | 0.976 |
| 928-28 | CRF02_AG | >50 | >50 | 4.696 | 3.121 |
| T251-18 | CRF02_AG | >50 | >50 | 7.395 | 3.459 |
| T278-50 | CRF02_AG | >50 | >50 | 18.276 | 12.017 |
| 263-8 | CRF02_AG | 24.576 | >50 | 6.527 | 7.779 |
| 235-47 | CRF02_AG | 1.676 | >50 | 0.163 | 0.069 |
| A07412M1.vrc12 | D | 0.406 | 16.947 | 0.048 | 0.044 |
| X1193_c1 | G | 0.202 | 11.859 | 0.475 | 0.195 |
| X1254_c3 | G | 0.199 | 0.222 | 0.297 | 0.112 |

Цифрами указаны концентрации IgG-антител в мкг/мл для достижения IC50 в анализе нейтрализации TZM-bl. Значения IC50 кодированы цветом, и возрастающая чувствительность к нейтрализации указана от темно-зеленого до темно-красного цвета. > показывает, что IC50 для данного вируса не была достигнута при тестируемой концентрации.

Таблица 13

| Идентификац ионный номер животного | SHIVAD8EO | | | Концентр ация Ат (мкг/мл) в 0 день | титр (ТЗМ- b1) в 0 день | Идентификац ионный номер животного | SHIVDH12-V3AD8 | | | Концентра ция Ат (мкг/мл) в 0 день | Титр (ТЗМ-b1) в 0 день |
|---|-----------|--------------|------------|---|-------------------------------|---|----------------|---------------|------------|---|------------------------------|
| | Ат | Доза | защищенные | | | | Ат | доза | защищенные | | |
| RHDEGF | VRC01 | 50 мг/кг | Да | 586,9 | 1:162 | RHDEJ3 | VRC01 | 30 мг/кг | Да | 395,8 | 1:52 |
| RHDEH3 | | | Нет | 711,0 | 1:176 | RHKZ1 | | | Нет | 306,0 | 1:70 |
| RHDE1L | | 20 мг/кг | Нет | 206,5 | 1:65 | RHKZA | PGT121 | 20 мг/кг | Да | 215,1 | 1:13120 |
| RHJBN | | | Нет | 188,1 | 1:68 | RHDECT | | | Да | 200,7 | 1:13805 |
| RHKNX | PGT121 | 20 мг/кг | Да | 267,9 | 1:2495 | RHKTL | | | Да | 282,7 | 1:12669 |
| RHMK4 | | | Да | 253,6 | 1:2773 | RHPZ9 | | | Да | 133,1 | 1:12055 |
| RHDE9J | | 5 мг/кг | Да | 55,7 | 1:563 | RHK2Z | | 1 мг/кг | Да | 15,1 | 1:422 |
| RHPNR | | | Нет | 47,2 | 1:618 | RHMT8 | | | Нет | 29,3 | 1:539 |
| RHDCGI | | 1 мг/кг | Да | 24,0 | 1:116 | RHDEEB | | 0,2 мг/кг | Да | 3,1 | 1:159 |
| RHKNE | | | Да | 19,7 | 1:55 | RHDEP2 | | | Да | 1,6 | 1:101 |
| RHK44 | | 0,2 мг/кг | Нет | 1,8 | < 1:20 | RHMFJ | | 0,05 мг/кг | Нет | 1,0 | <1:20 |
| RHK49 | | | Нет | 1,8 | 1:17 | RHKIA | | | Нет | 1,3 | <1:20 |
| RHDEEM | 10-1074 | 20 мг/кг | Да | 289,8 | 1:2004 | RHKIM | 10- 1074 | 20 мг/кг | Да | 290,3 | 1:1972 |
| RHKIL | | | Да | 257,7 | 1:2075 | RHKWM | | | Да | 173,3 | 1:2282 |
| RHME1 | | 5 мг/кг | Да | 112,9 | 1:633 | RHMJW | | 5 мг/кг | Да | 96,6 | 1:420 |
| RHPNV | | | Да | 117,5 | 1:384 | RHMJT | | | Да | 95,3 | 1:376 |
| RHPID | | 1 мг/кг | Нет | 19,9 | 1:56 | RHDENI | | 1 мг/кг | Да | 28,4 | 1:106 |
| RHDCHX | | | Нет | 24,8 | 1:53 | RHJHZ | | | Нет | 18,6 | 1:136 |
| RHPZE | 3BNC117 | 5 мг/кг | Да | 105,4 | 1:272 | RHHE8 | | 0,2 мг/кг | Нет | 19,4 | 1:39 |
| RHPM5 | | | Да | 76,1 | 1:372 | RHKCZ | | | Нет | 19,7 | 1:35 |
| RHKMH | | 1 мг/кг | Нет | 39,6 | 1:55 | RHMFBA | 3BNC11 7 | 20 мг/кг | Да | 294,9 | 1:143 |
| RHMJ5 | | | Нет | 15,1 | 1:75 | RHMER | | | Да | 272,7 | 1:142 |
| RHPLD | 45-46m2 | 20 мг/кг | Нет | 15,0 | 1:27 | RHKIV | | 5 мг/кг | Да | 114,6 | 1:80 |
| RHMA9 | | | Нет | 17,6 | < 1:20 | RHKPI | | | Нет | 133,1 | 1:90 |
| RHMC6 | | 5 мг/кг | Нет | 2,3 | < 1:20 | RHDE9D | | 1 мг/кг | Нет | 23,3 | 1:20 |
| RHDEOCA | | | Нет | 2,2 | < 1:20 | RHDEW7 | | | Да | 29,6 | 1:18 |
| RHML1 | DEN3 | 20 мг/кг | Нет | ND | < 1:20 | RHMEV | | 0,2 мг/кг | Нет | 3,9 | < 1:20 |
| RHMAA | | | Нет | ND | < 1:20 | RHMF9 | | | Нет | 5,7 | < 1:20 |
| | | | | | | RHKZMA | 45- 46m2 | 5 мг/кг | Нет | 2,1 | ND |
| | | | | | | RHKNP | | | Нет | 4,0 | ND |
| | | | | | | RHJII | hu-IgG | 100 мг/кг | Нет | ND | ND |
| | | | | | | RHJK1 | | | Нет | ND | ND |

Таблица 14

IC50 в клетках TZM-b11

| Идентификационный номер образца | S321 | C500 | B520 | G435 | T520b | M263 | M600c | HIVIG (мкг/мл) | Фенотип Tier |
|---------------------------------|-------|------|------|------|-------|-------|-------|----------------|--------------|
| R5 SHIVDH12-V3AD8 | 321 | 289 | 77 | 172 | 168 | 429 | 134 | 132 | 2 |
| R5 SHIVAD8-EO | 48 | 36 | 39 | 31 | 41 | 44 | 48 | 1768 | 2 |
| X4 SHIVDH12-CL7 | 110 | 94 | 50 | 65 | 109 | 115 | 65 | 530 | 2 |
| HIV-1CAAN5342.A2 | 84 | <20 | 27 | <20 | <20 | 77 | 185 | 638 | 2 |
| HIV-1MN.3 | 13944 | 9152 | 822 | 8432 | 3968 | 43722 | 1709 | 1,81 | 1 |

1 Значения представляют разведение в сыворотке, при котором относительные единицы флуоресценции (RLU) были снижены на 50% по сравнению с лунками с контрольным вирусом (без тестируемого образца)

Таблица 15

SHIVAD8EO

| Конечная нейтрализация | Количество животных | | Накопленное значение | | Защищенные | |
|------------------------|---------------------|----------------|-------------------------|-----------------------------|------------|------------------|
| | Защищенные | Инфицированные | Защищенные ^a | Инфицированные ^b | Отношение | % |
| титр в плазме | | | | | | |
| 2773 | 1 | 0 | 12 | 0 | 12/12 | 100% |
| 2495 | 1 | 0 | 11 | 0 | 11/11 | 100% |
| 2075 | 1 | 0 | 10 | 0 | 10/10 | 100% |
| 2004 | 1 | 0 | 9 | 0 | 9/9 | 100% |
| 633 | 1 | 0 | 8 | 0 | 8/8 | 100% |
| 618 | 0 | 1 | 7 | 1 | 7/8 | 88% |
| 563 | 1 | 0 | 7 | 1 | 7/8 | 88% |
| 384 | 1 | 0 | 6 | 1 | 6/7 | 86% |
| 372 | 1 | 0 | 5 | 1 | 5/6 | 83% |
| 272 | 1 | 0 | 4 | 1 | 4/5 | 80% |
| 176 | 0 | 1 | 3 | 2 | 3/5 | 60% |
| 162 | 1 | 0 | 3 | 2 | 3/5 | 60% |
| 115 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2/4 | 50% ^c |
| 75 | 0 | 1 | 1 | 3 | 1/4 | 25% |
| 68 | 0 | 1 | 1 | 4 | 1/5 | 20% |
| 65 | 0 | 1 | 1 | 5 | 1/6 | 17% |
| 56 | 0 | 1 | 1 | 6 | 1/7 | 14% |
| 55 | 1 | 0 | 1 | 6 | 1/7 | 14% |
| 55 | 0 | 1 | 0 | 7 | 0/7 | 0% |
| 53 | 0 | 1 | 0 | 8 | 0/8 | 0% |
| 27 | 0 | 1 | 0 | 9 | 0/9 | 0% |
| 20 | 0 | 1 | 0 | 10 | 0/10 | 0% |
| 20 | 0 | 1 | 0 | 11 | 0/11 | 0% |
| 20 | 0 | 1 | 0 | 12 | 0/12 | 0% |
| 20 | 0 | 1 | 0 | 13 | 0/13 | 0% |
| 17 | 0 | 1 | 0 | 14 | 0/14 | 0% |

a сумма снизу.

b сумма сверху.

c вычисленный конечный титр защиты (50% защитный титр) составлял 1:115

Таблица 16

SHIVDH12-V3AD8

| Конечная нейтрализация | Количество животных | | Накопленное значение | | Защищенные | |
|------------------------|---------------------|----------------|-------------------------|-----------------------------|------------|------------------|
| | Защищенные | Инфицированные | Защищенные ^a | Инфицированные ^b | Отношение | % |
| Титр в плазме | | | | | | |
| 13805 | 1 | 0 | 16 | 0 | 16/16 | 100% |
| 13120 | 1 | 0 | 15 | 0 | 15/15 | 100% |
| 12669 | 1 | 0 | 14 | 0 | 14/14 | 100% |
| 12055 | 1 | 0 | 13 | 0 | 13/13 | 100% |
| 2282 | 1 | 0 | 12 | 0 | 12/12 | 100% |
| 1972 | 1 | 0 | 11 | 0 | 11/11 | 100% |
| 539 | 0 | 1 | 10 | 1 | 10/11 | 91% |
| 422 | 1 | 0 | 10 | 1 | 10/11 | 91% |
| 420 | 1 | 0 | 9 | 1 | 9/10 | 90% |
| 376 | 1 | 0 | 8 | 1 | 8/9 | 89% |
| 159 | 1 | 0 | 7 | 1 | 7/8 | 88% |
| 143 | 1 | 0 | 6 | 1 | 6/7 | 86% |
| 142 | 1 | 0 | 5 | 1 | 5/6 | 83% |
| 136 | 0 | 1 | 4 | 2 | 4/6 | 67% |
| 106 | 1 | 0 | 4 | 2 | 4/6 | 67% |
| 101 | 1 | 0 | 3 | 2 | 3/5 | 60% |
| 90 | 0 | 1 | 2 | 3 | 2/5 | 40% ^c |
| 80 | 1 | 0 | 2 | 3 | 2/5 | 40% |
| 70 | 0 | 1 | 1 | 4 | 1/5 | 20% |
| 52 | 1 | 0 | 1 | 4 | 1/5 | 20% |
| 39 | 0 | 1 | 0 | 5 | 0/5 | 0% |
| 35 | 0 | 1 | 0 | 6 | 0/6 | 0% |
| 20 | 0 | 1 | 0 | 7 | 0/7 | 0% |
| 20 | 0 | 1 | 0 | 8 | 0/8 | 0% |
| 20 | 0 | 1 | 0 | 9 | 0/9 | 0% |
| 20 | 0 | 1 | 0 | 10 | 0/10 | 0% |
| 20 | 0 | 1 | 0 | 11 | 0/11 | 0% |
| 20 | 0 | 1 | 0 | 12 | 0/12 | 0% |
| 20 | 0 | 1 | 0 | 13 | 0/13 | 0% |

a сумма снизу

^b сумма сверху^c вычисленный конечный титр защиты (50% защитный титр) составлял 1:95,5

Таблица 17

| Животное | Недели после инфекции | Перед инфекцией | | Перед лечением мАТ | |
|----------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|----------------------|
| | | Т-клетки CD4+ клеток/мкл | Т-клетки CD4+ клеток/мкл | вирусная нагрузка копий РНК/мл | клинический статус |
| DBZ3 | 159 | 650 | 118 | 1,08E+04 | без симптомов |
| DC99A | 159 | 623 | 165 | 7,60E+03 | без симптомов |
| DBXE | 163 | 1585 | 158 | 1,96E+05 | Периодическая диарея |
| DCF1 | 157 | 1203 | 105 | 1,44E+05 | Периодическая диарея |
| DCM8 | 163 | 608 | 43 | 1,59E+03 | Периодическая диарея |

Таблица 18

| Животное | Время обработки (дни) | Количество копий РНК | |
|----------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|
| | | Gag SIV на 108 клеток | ДНК Gag SIV на 108 клеток |
| DBZ3 | 0 | 9000 | 6700 |
| DBZ3 | 10 | 360 | 7500 |
| DBZ3 | 20 | 2400 | 14000 |
| DC99A | 0 | 31000 | 1400 |
| DC99A | 14 | 18000 | 5600 |
| DC99A | 20 | 8100 | 2700 |
| DBXE | 0 | 470000 | 71000 |
| DBXE | 14 | 17000 | 33000 |
| DBXE | 17 | 11000 | 22000 |
| DCM8 | 0 | 110000 | 8600 |
| DCM8 | 14 | 1700 | 1600 |
| DCM8 | 20 | 22000 | 6600 |
| DCF1 | 0 | 240000 | 15000 |
| DCF1 | 14 | 190000 | 11000 |
| DCF1 | 20 | 1100000 | 14000 |

Приведенные выше примеры и описание предпочтительных вариантов следует воспринимать как иллюстративные, а не ограничивающие настоящее изобретение, которое определено формулой изобретения. Как может быть легко понятно, могут быть использованы многочисленные изменения и сочетания признаков, указанных выше, не выходя за рамки объема настоящего изобретения, который указан в формуле изобретения. Такие изменения не следует рассматривать как выход за рамки объема изобретения, и все такие изменения должны быть включены в объем следующей далее формулы изобретения. Все публикации, цитированные в настоящем описании, включены в описание в полном объеме.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное биспецифическое анти-ВИЧ антитело, или его антигенсвязывающая часть, содержащее первое антигенсвязывающее плечо и второе антигенсвязывающее плечо,
где первое антигенсвязывающее плечо и второе антигенсвязывающее плечо специфически связываются с различными эпитопами или молекулами,
где первое антигенсвязывающее плечо связывается с антигеном на ВИЧ и содержит CDRH 1, CDRH 2, CDRH 3, CDRL 1, CDRL 2 и CDRL 3,

где CDRH 1, CDRH 2, CDRH 3, CDRL 1, CDRL 2 и CDRL 3 содержат соответствующие последовательности набора CDR, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 69-74, SEQ ID NO: 57-62 и SEQ ID NO: 93-98.

2. Выделенное биспецифическое анти-ВИЧ антитело, или его антигенсвязывающая часть, по п.1, где первое антигенсвязывающее плечо содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 13-14, SEQ ID NO: 9-10 или SEQ ID NO: 21-22 соответственно.

3. Выделенное биспецифическое анти-ВИЧ антитело, или его антигенсвязывающая часть, п.2, где переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи содержат соответствующие последовательности SEQ ID NO: 13-14.

4. Выделенное биспецифическое анти-ВИЧ антитело, или его антигенсвязывающая часть, по п.1, где CDRH 1, CDRH 2, CDRH 3, CDRL 1, CDRL 2 и CDRL 3 содержат последовательности SEQ ID NO: 69-74.

5. Выделенное биспецифическое анти-ВИЧ антитело, или его антигенсвязывающая часть, по любому из пп.1-4, где второе антигенсвязывающее плечо связывается с CD3.

6. Выделенное биспецифическое анти-ВИЧ антитело, или его антигенсвязывающая часть, по любому из пп.1-5, где антитело представляет собой антитело человека, гуманизированное антитело или химерное антитело.

7. Выделенное биспецифическое анти-ВИЧ антитело, или его антигенсвязывающая часть, по любому из пп.1-6, где первое антигенсвязывающее плечо выбрано из Fab, F(ab')₂, Fv и scFv.

8. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая по меньшей мере одну последовательность, кодирующую биспецифическое анти-ВИЧ антитело по любому из пп.1-7 или его антигенсвязывающую часть.

9. Вектор для экспрессии биспецифического анти-ВИЧ антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-7, содержащий нуклеиновую кислоту по п.8.

10. Культивируемая клетка для экспрессии биспецифического анти-ВИЧ антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-7, содержащая нуклеиновую кислоту по п.8 или вектор по п.9.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая

(i) по меньшей мере одно анти-ВИЧ антитело, или его антигенсвязывающую часть, по любому из пп.1-7, или нуклеиновую кислоту по п.8, или вектор по п.9; и

(ii) фармацевтически приемлемый носитель.

12. Фармацевтическая композиция по п.11, также содержащая второе терапевтическое средство.

13. Фармацевтическая композиция по п.12, где второе терапевтическое средство включает противовирусное средство, или второе анти-ВИЧ антитело, или его антигенсвязывающую часть.

14. Способ профилактики или лечения ВИЧ-инфекции или заболевания, связанного с ВИЧ, у пациента, включающий введение пациенту терапевтического средства, содержащего терапевтически эффективное количество анти-ВИЧ антитела по любому из пп.1-7 или его антигенсвязывающую часть.

15. Способ по п.14, также включающий введение второго терапевтического средства.

16. Способ по п.15, также включающий введение противовирусного средства.

17. Применение по меньшей мере одного биспецифического анти-ВИЧ-антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-7 для профилактики или лечения ВИЧ-инфекции.

18. Применение нуклеиновой кислоты по п.8 для профилактики или лечения ВИЧ инфекции.

19. Применение вектора по п.9 для профилактики или лечения ВИЧ инфекции.

20. Способ получения биспецифического анти-ВИЧ антитела или его антигенсвязывающей части, включающий

получение культивируемой клетки по п.10;

культивирование этой клетки в среде в условиях, допускающих экспрессию полипептида, кодируемого вектором, и

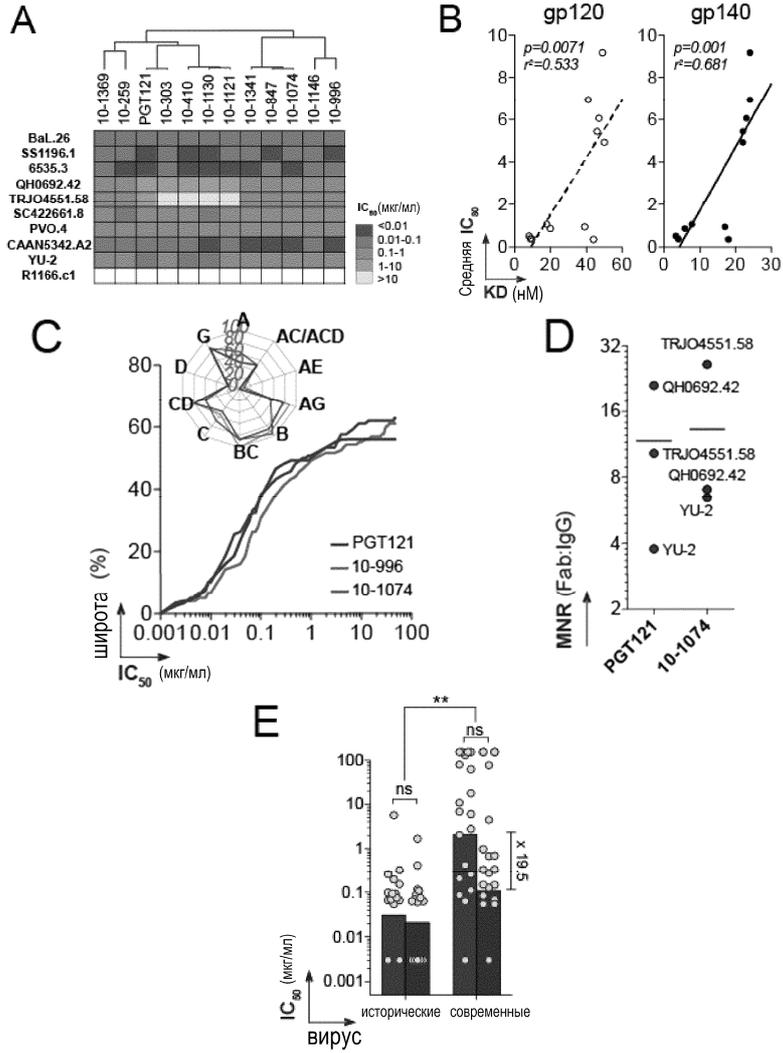
очистку антитела или его антигенсвязывающей части из культивируемой клетки или клеточной среды.

21. Набор для профилактики или лечения ВИЧ инфекции, содержащий:

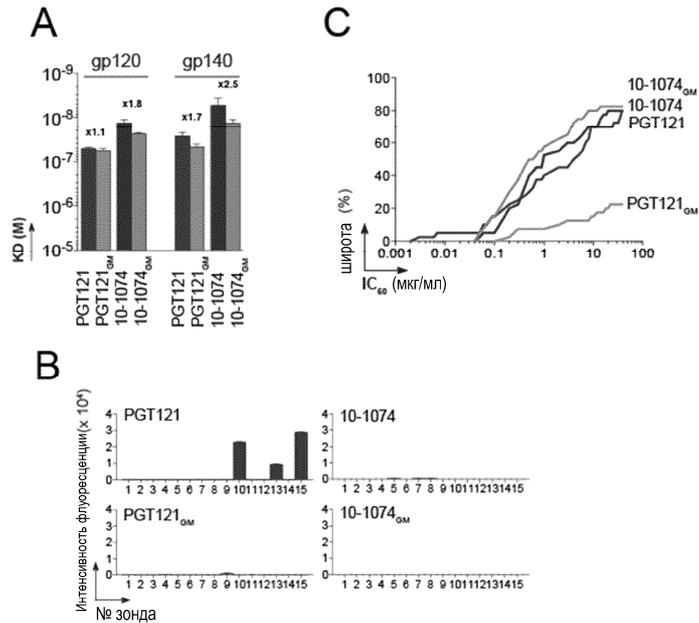
(i) фармацевтически приемлемую лекарственную форму фармацевтически эффективного количества, по меньшей мере, выделенного биспецифического анти-ВИЧ антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-7, или нуклеиновой кислоты по п.8, или вектора по п.9, и

(ii) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемую лекарственную дозу фармацевтически эффективного количества по меньшей мере одного выделенного биспецифического анти-ВИЧ-антитела, или его антигенсвязывающей части, или нуклеиновой кислоты, или вектора.

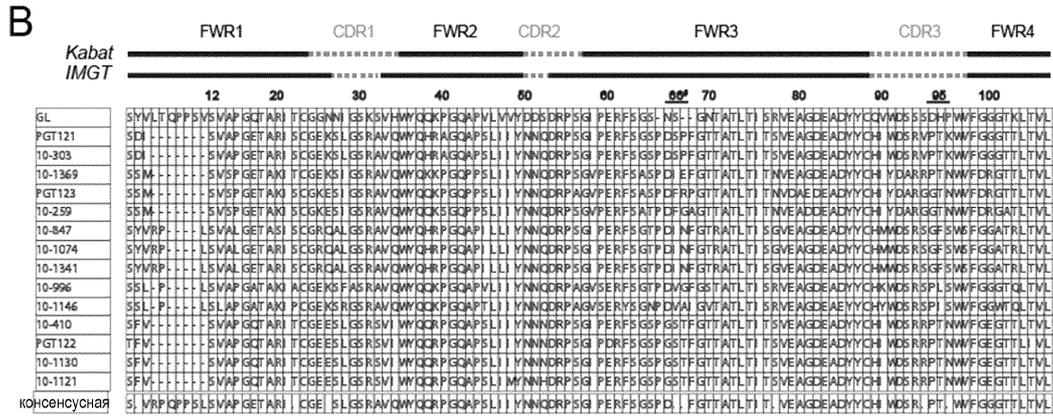
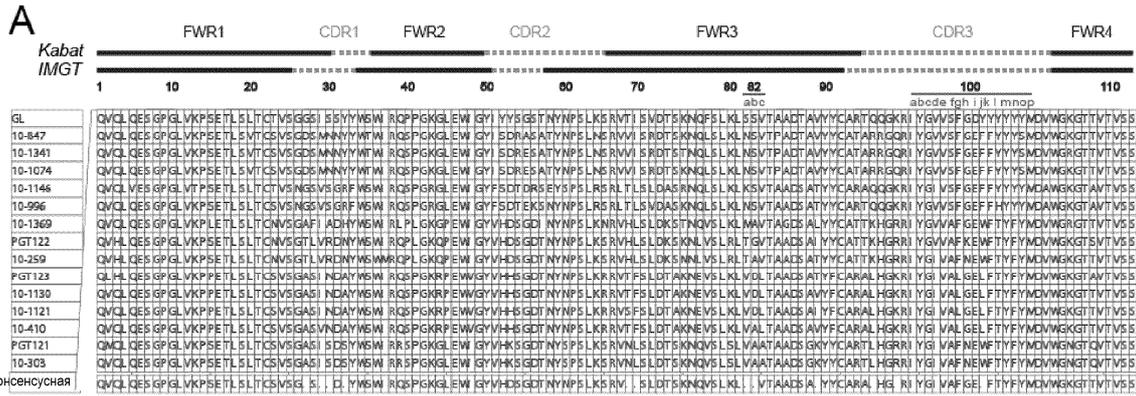
22. Набор по п.21, также содержащий фармацевтически приемлемую лекарственную форму фармацевтически эффективного количества любого анти-ВИЧ средства, где две фармацевтически приемлемые лекарственные формы могут необязательно находиться в форме общей фармацевтически приемлемой лекарственной формы.



Фиг. 1



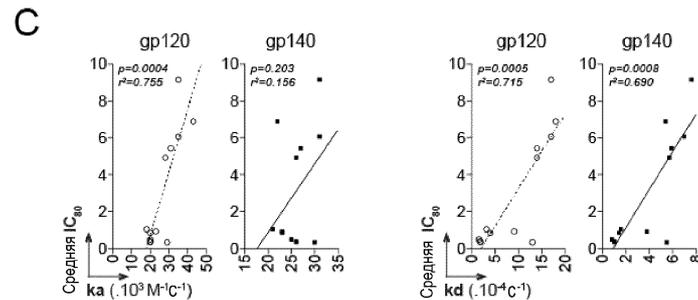
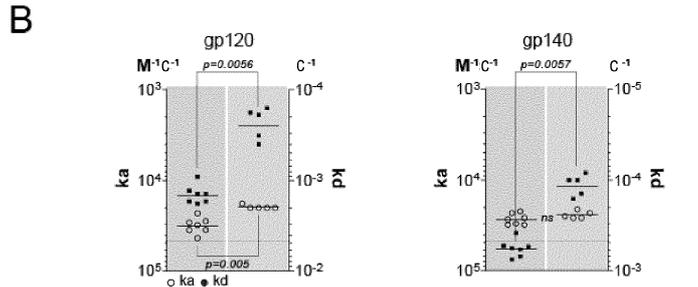
Фиг. 2



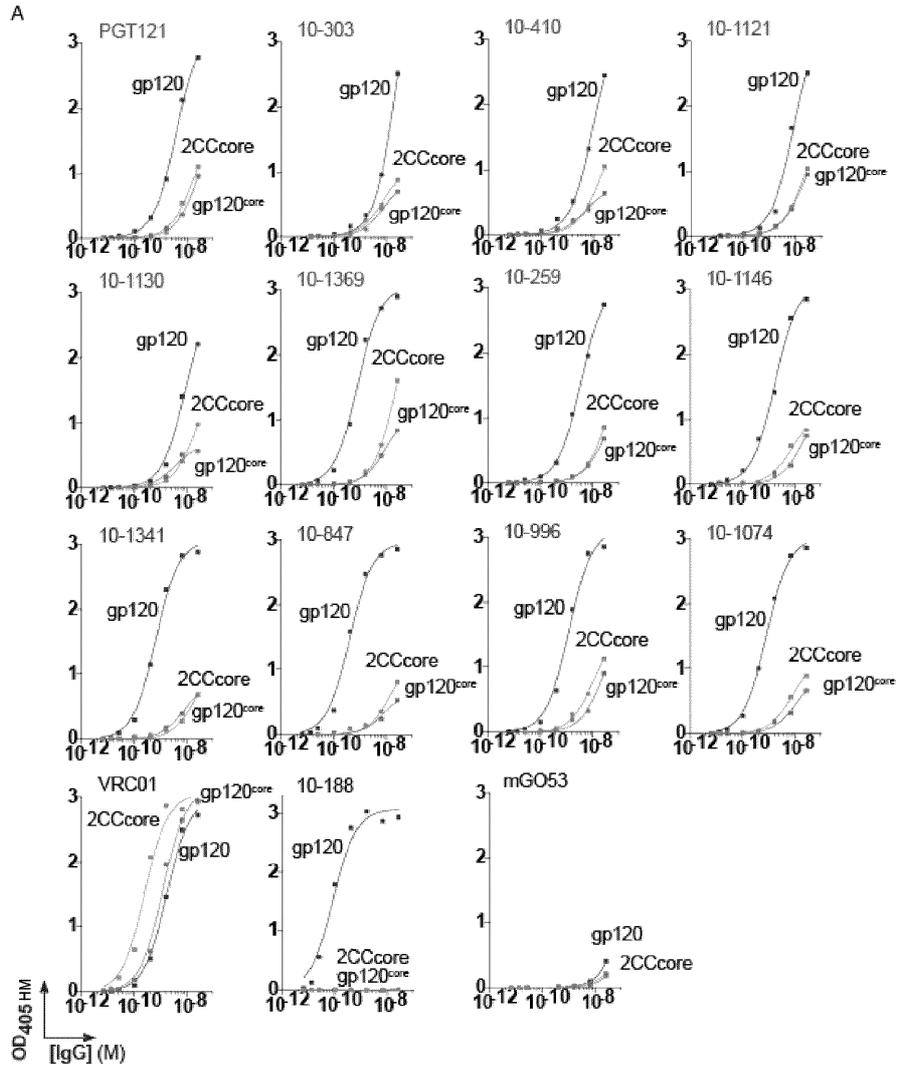
Фиг. 3

A

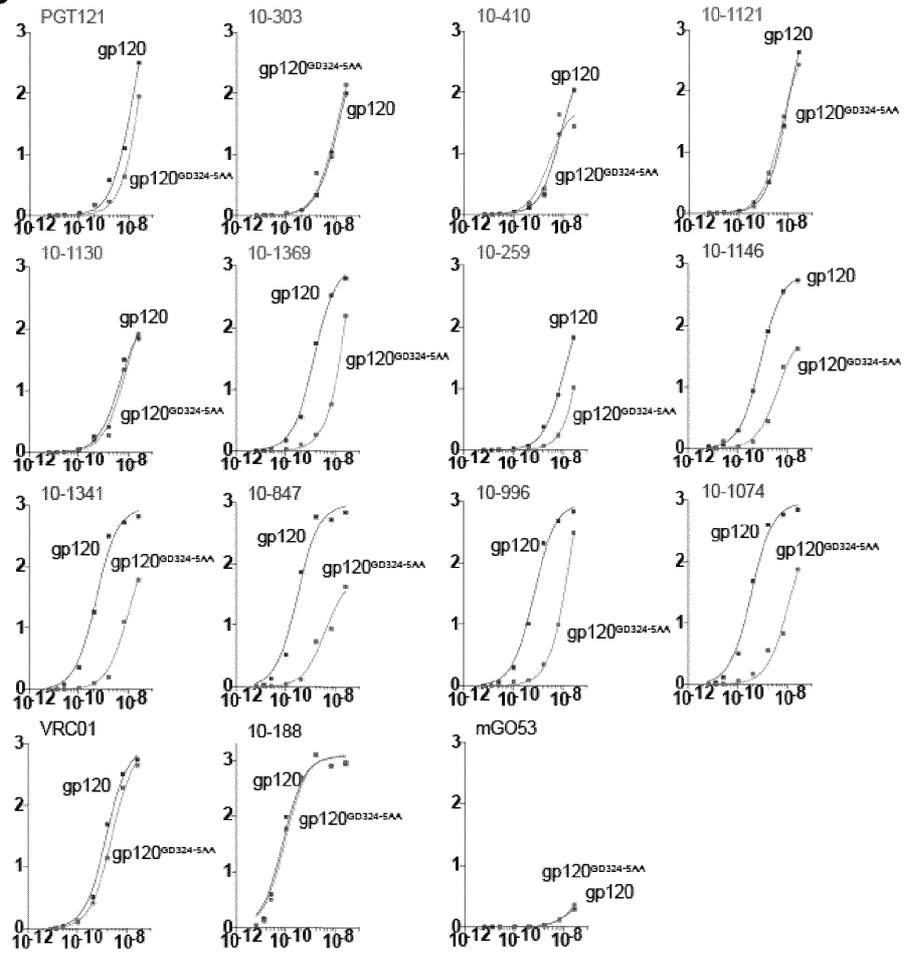
| | gp120 | | | | | gp140 | | | | |
|---------|---------|----------|---------|----------|---------------|-----------|----------|---------|----------|---------------|
| | ka (Mc) | kd (1/c) | KD (M) | KA (M-1) | χ^2 (RU) | ka (1/Mc) | kd (1/c) | KD (M) | KA (M-1) | χ^2 (RU) |
| 10-259 | 2.9E+04 | 1.3E-03 | 4.4E-08 | 2.3E+07 | 4.7E-01 | 3.0E+04 | 5.5E-04 | 1.8E-08 | 5.5E+07 | 1.6E+00 |
| 10-303 | 4.3E+04 | 1.8E-03 | 4.1E-08 | 2.4E+07 | 3.1E-01 | 2.2E+04 | 5.4E-04 | 2.4E-08 | 4.2E+07 | 7.9E-01 |
| 10-410 | 3.5E+04 | 1.7E-03 | 4.7E-08 | 2.1E+07 | 4.9E-01 | 3.1E+04 | 7.0E-04 | 2.3E-08 | 4.4E+07 | 1.4E+00 |
| 10-847 | 2.0E+04 | 1.8E-04 | 8.9E-09 | 1.1E+08 | 1.6E+00 | 2.6E+04 | 1.0E-04 | 3.9E-09 | 2.6E+08 | 3.0E+00 |
| 10-996 | 1.8E+04 | 3.2E-04 | 1.8E-08 | 5.5E+07 | 7.5E-01 | 2.1E+04 | 1.6E-04 | 7.8E-09 | 1.3E+08 | 1.4E+00 |
| 10-1074 | 2.0E+04 | 1.9E-04 | 9.5E-09 | 1.1E+08 | 1.4E+00 | 2.6E+04 | 1.0E-04 | 4.0E-09 | 2.5E+08 | 2.9E+00 |
| 10-1121 | 3.1E+04 | 1.4E-03 | 4.6E-08 | 2.2E+07 | 4.4E-01 | 2.7E+04 | 5.9E-04 | 2.2E-08 | 4.6E+07 | 1.4E+00 |
| 10-1130 | 3.5E+04 | 1.7E-03 | 4.9E-08 | 2.0E+07 | 4.3E-01 | 3.1E+04 | 7.6E-04 | 2.4E-08 | 4.1E+07 | 1.4E+00 |
| 10-1146 | 2.0E+04 | 4.0E-04 | 2.0E-08 | 4.9E+07 | 1.1E+00 | 2.3E+04 | 1.4E-04 | 5.8E-09 | 1.7E+08 | 2.6E+00 |
| 10-1341 | 2.0E+04 | 1.6E-04 | 8.2E-09 | 1.2E+08 | 1.5E+00 | 2.5E+04 | 8.3E-05 | 3.3E-09 | 3.1E+08 | 4.0E+00 |
| 10-1369 | 2.3E+04 | 9.1E-04 | 3.9E-08 | 2.6E+07 | 7.0E-01 | 2.3E+04 | 3.8E-04 | 1.7E-08 | 6.0E+07 | 1.6E+00 |
| PGT121 | 2.8E+04 | 1.4E-03 | 5.0E-08 | 2.0E+07 | 4.8E-01 | 2.6E+04 | 5.7E-04 | 2.2E-08 | 4.6E+07 | 1.5E+00 |
| GL | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |



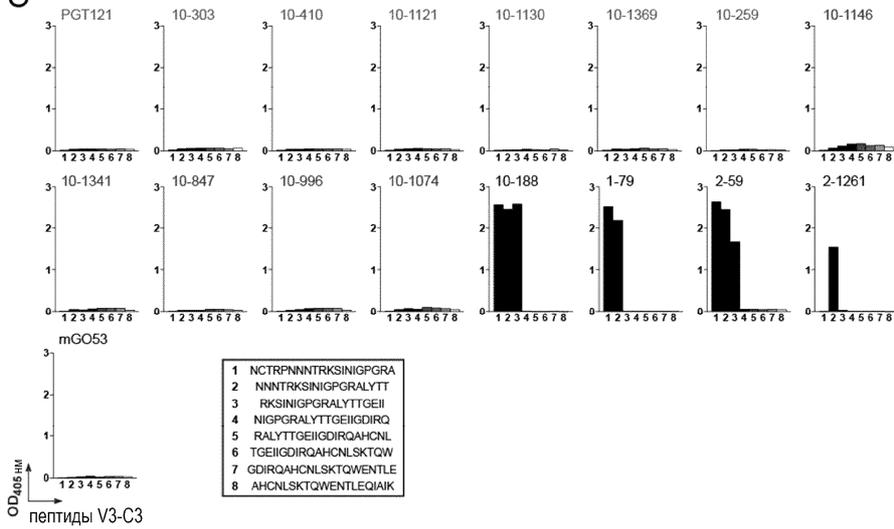
Фиг. 4



B

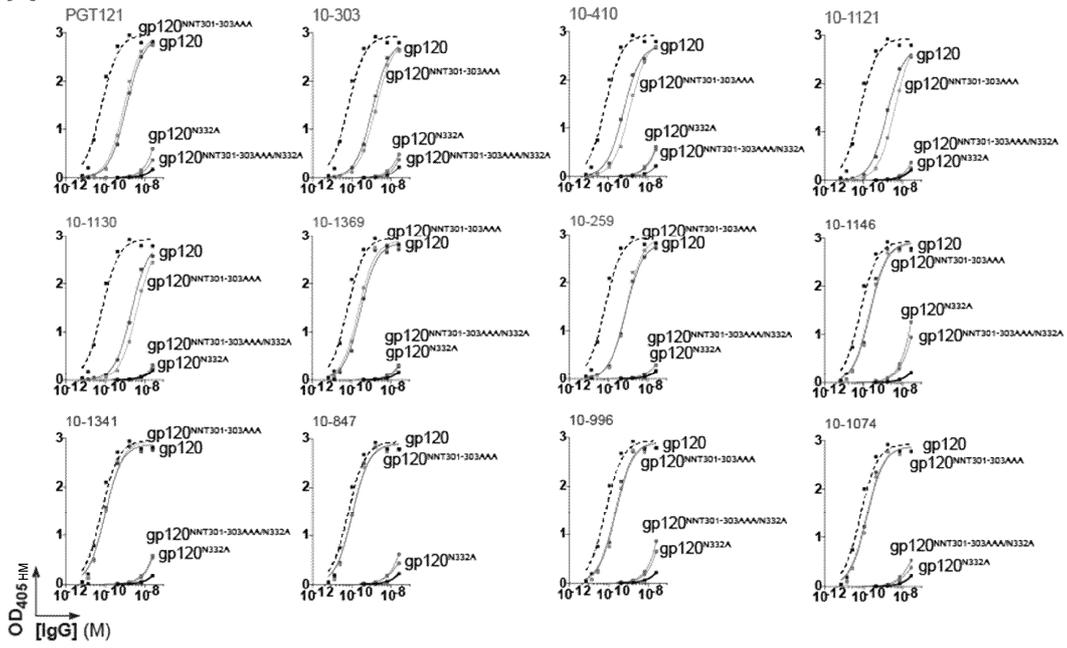


C

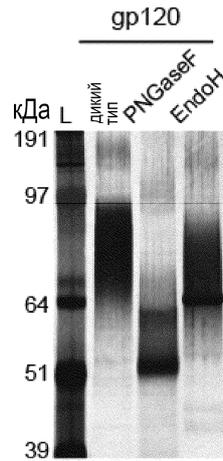


Фиг. 5

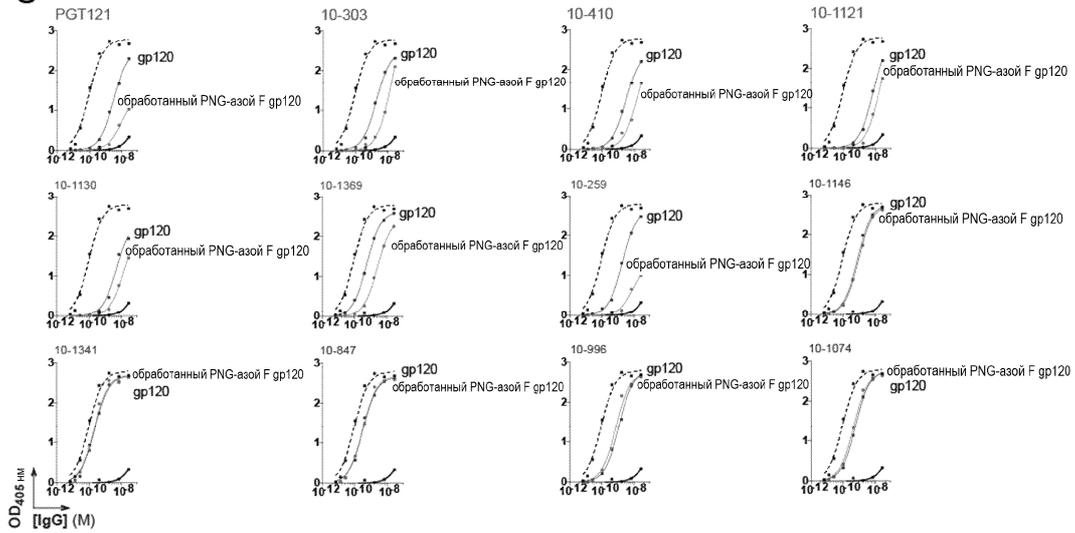
A

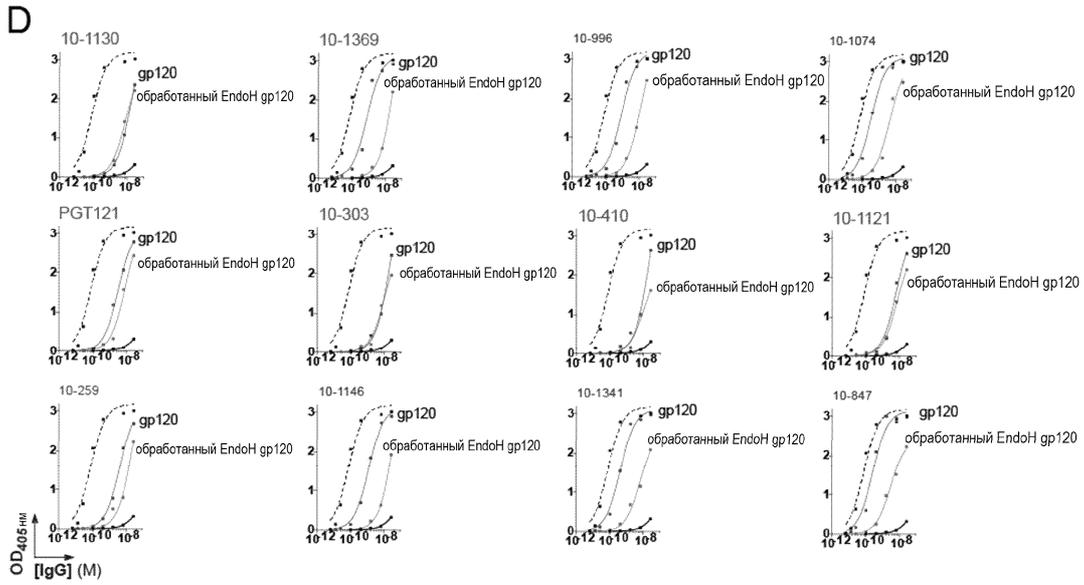


B



C

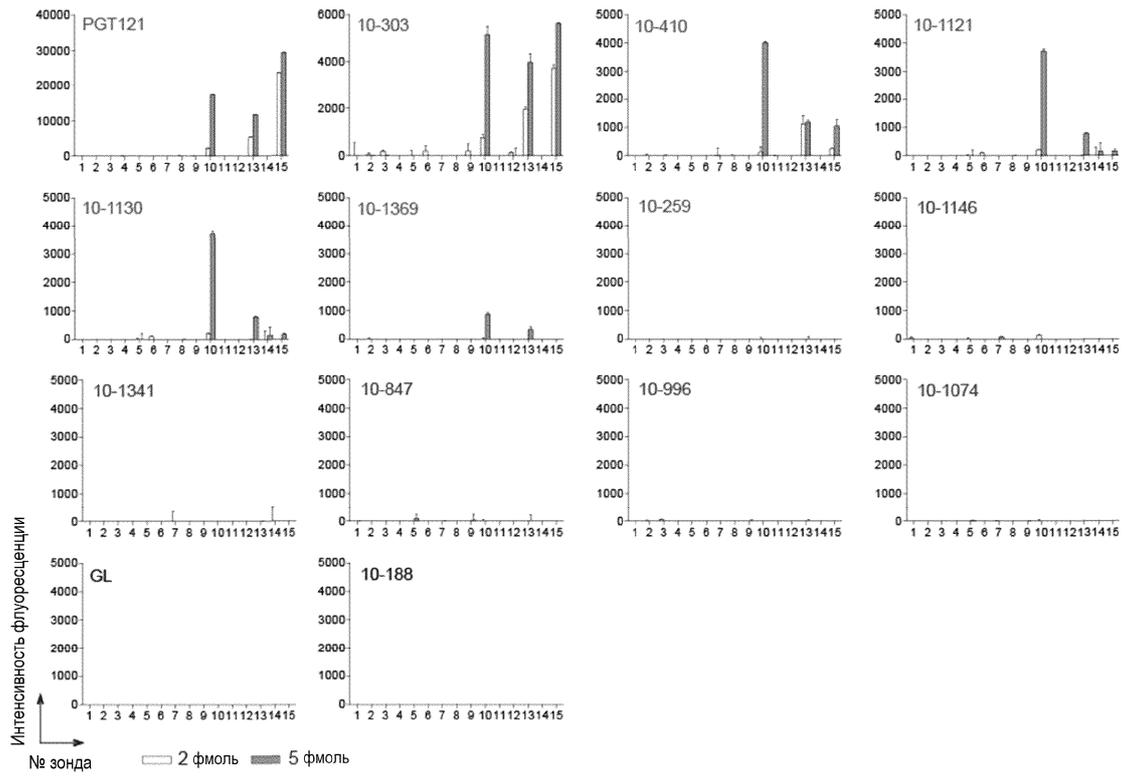




Фиг. 6

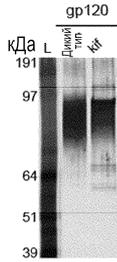


В

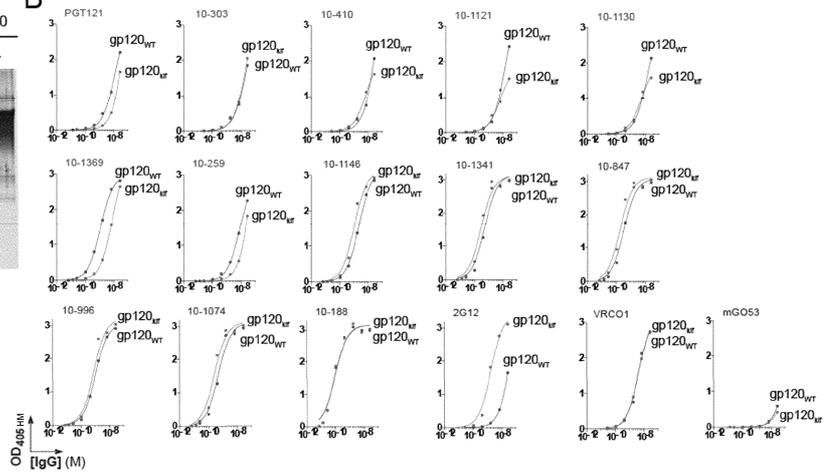


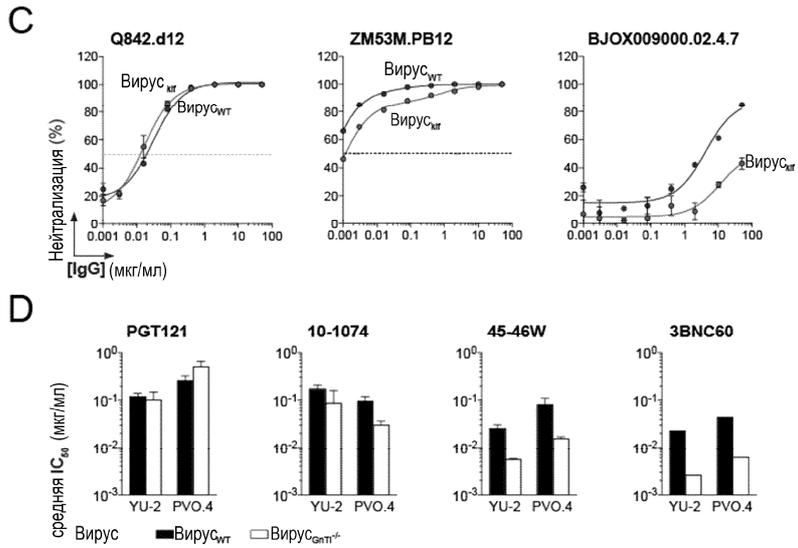
Фиг. 7

А

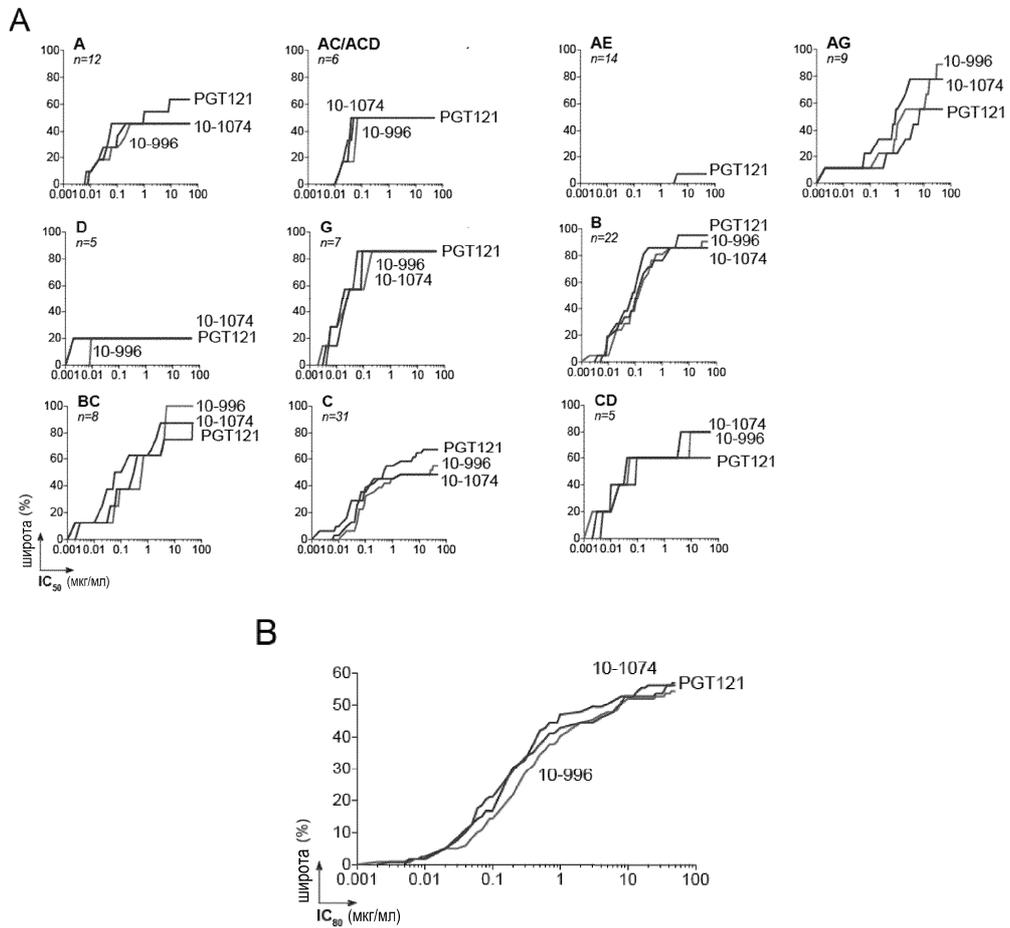


В

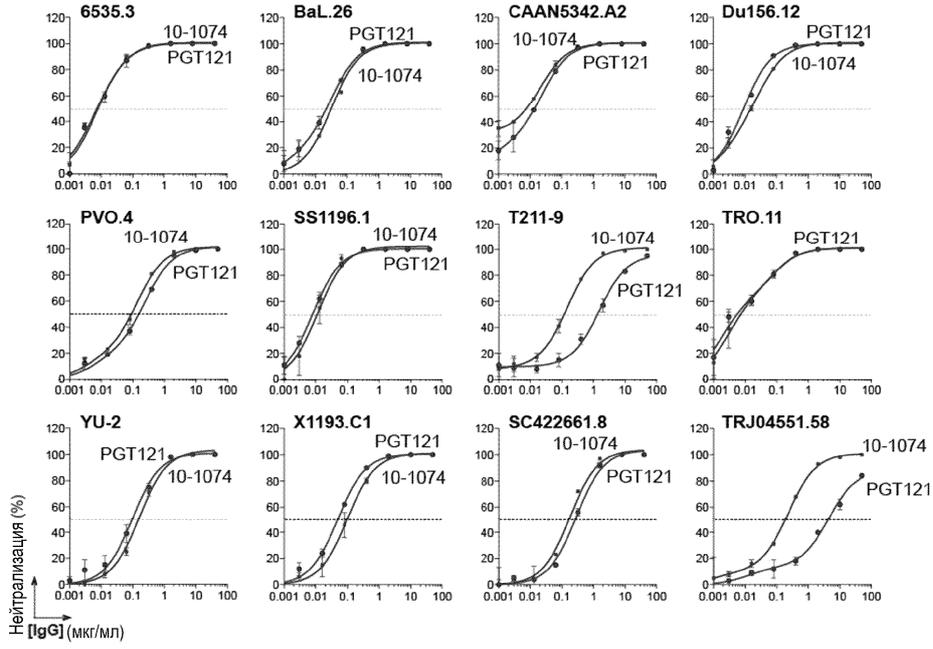




Фиг. 8

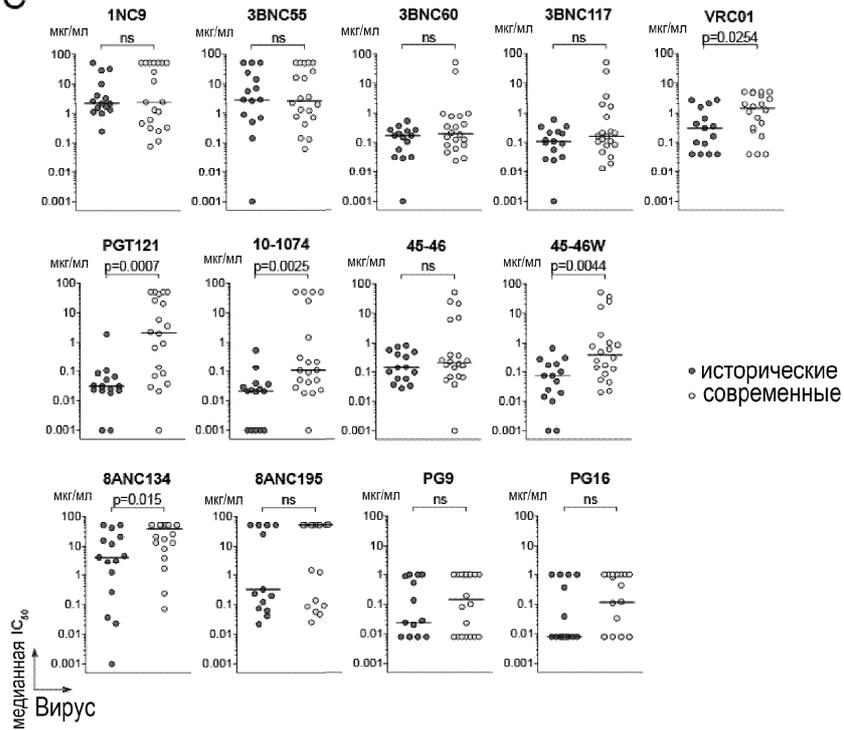


C



Фиг. 9

C



Фиг. 10

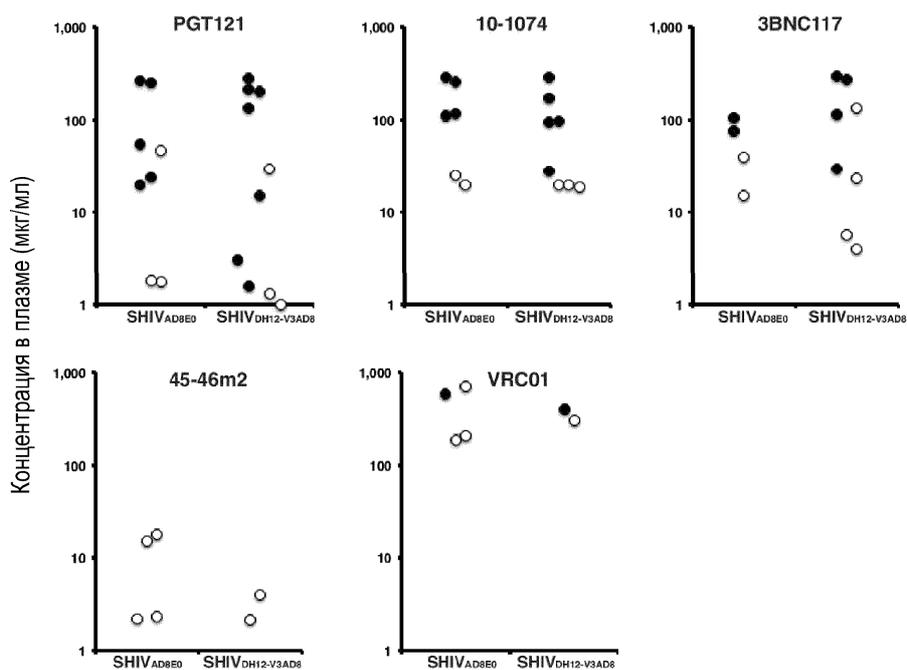
A

| IC50 TZM-bl (мкг/мл) | |
|----------------------|------|
| VRC01 | 0.94 |
| NIH 45-46 | 0.92 |
| 45-46m2 | 0.29 |
| 45-46 G54W | 0.28 |
| 3BNC117 | 0.14 |
| 12A12 | 6.36 |
| 1NC9 | 2.04 |
| 8ANC195 | 3.38 |
| 10-1074 | 0.15 |
| PGT-121 | 0.10 |
| PGT-126 | 0.09 |

B

| IC50 TZM-bl (мкг/мл) | |
|----------------------|-------|
| VRC01 | 2.35 |
| NIH 45-46 | 1.48 |
| 45-46m2 | 0.52 |
| 45-46 G54W | 0.44 |
| 3BNC117 | 0.39 |
| 12A12 | 86.27 |
| 1NC9 | 30.26 |
| 8ANC195 | 3.08 |
| 10-1074 | 0.06 |
| PGT-121 | 0.01 |
| PGT-126 | 0.16 |

Фиг. 11



Фиг. 12

a

| | ID ₅₀ (мкг/мл) | |
|----------|---------------------------|---------|
| | 10-1074 | 3BNC117 |
| X2088_9 | 0.013 | >100 |
| Q769_d22 | >100 | 0.024 |

b

| плазма + мАт | Титр ID ₅₀ в сыворотке, преобразованный в соответствующую концентрацию антитела 10-1074 и 3BNC117 (мкг/мл) | | | |
|-------------------|---|----------|---------|----------|
| | X2088_9 | Q769_d22 | X2088_9 | Q769_d22 |
| preP_0.01_3BNC117 | <20 | <20 | <0.26 | <0.48 |
| preP_0.1_3BNC117 | <20 | <20 | <0.26 | <0.48 |
| preP_1_3BNC117 | <20 | 27 | <0.26 | 0.65 |
| preP_10_3BNC117 | <20 | 340 | <0.26 | 8.16 |
| preP_100_3BNC117 | <20 | 5,369 | <0.26 | 128.96 |
| preP_0.01_10-1074 | <20 | <20 | <0.26 | <0.48 |
| preP_0.1_10-1074 | <20 | <20 | <0.26 | <0.48 |
| preP_1_10-1074 | 54 | <20 | 0.70 | <0.48 |
| preP_10_10-1074 | 516 | <20 | 6.71 | <0.48 |
| preP_100_10-1074 | 11,419 | <20 | 148.45 | <0.48 |

preT - плазма разных НРР до обработки (DVZ3, DC99A, DCM8, DCF1, DVXE)

| Титр ID ₅₀ | | мкг/мл | |
|-----------------------|--------------|---------|----------|
| >5000 | >1000 - 5000 | >75 | >15 - 75 |
| >200 - 1000 | 40 - 200 | >5 - 15 | 1 - 5 |

Уровни мАт у NHP

С

Титр ID₅₀ в плазме преобразованный в соответствующую концентрацию антитела 10-1074 и ЗВНС117 (мкг/мл)

Титр ID₅₀ в плазме

| NHP | дни после инъекции | X2088_9 | Q769_d22 | 10-1074 | ЗВНС117 |
|-------|--------------------|---------|----------|---------|---------|
| DBZ3 | до иммунизации | <20 | <20 | <0.26 | <0.48 |
| | 3 | 15385 | 3178 | 200.01 | 76.27 |
| | 6 | 5784 | 1460 | 75.19 | 35.04 |
| | 10 | 3150 | 848 | 40.95 | 20.35 |
| | 14 | 2114 | 567 | 27.48 | 13.61 |
| | 17 | 1331 | 317 | 17.30 | 7.61 |
| | 20 | 1300 | 188 | 16.90 | 4.51 |
| | 24 | 485 | <20 | 6.31 | <0.48 |
| | 27 | 333 | <20 | 4.33 | <0.48 |
| | 34 | 85 | <20 | 1.11 | <0.48 |
| 41 | <20 | <20 | <0.26 | <0.48 | |
| 49 | <20 | <20 | <0.26 | <0.48 | |
| DCM8 | до иммунизации | <20 | <20 | <0.26 | <0.48 |
| | 3 | 6649 | 1977 | 86.44 | 47.45 |
| | 6 | 4799 | 1389 | 62.39 | 33.31 |
| | 10 | 2432 | 877 | 31.62 | 21.05 |
| | 14 | 1222 | 477 | 15.89 | 11.45 |
| | 17 | 797 | 249 | 10.36 | 5.98 |
| | 20 | 296 | 37 | 3.85 | 0.89 |
| 23 | 148 | <20 | 1.92 | <0.48 | |
| DBXE | до иммунизации | <20 | 24 | <0.26 | 0.58 |
| | 3 | 6962 | 1497 | 90.51 | 35.93 |
| | 6 | 3827 | 927 | 49.75 | 22.25 |
| | 10 | 1446 | 504 | 18.80 | 12.10 |
| | 14 | 957 | 242 | 12.44 | 5.81 |
| | 17 | 696 | 208 | 9.05 | 4.99 |
| | 20 | 415 | 190 | 5.40 | 4.56 |
| 23 | 378 | 131 | 4.91 | 3.14 | |
| DC99A | до иммунизации | <20 | <20 | <0.26 | <0.48 |
| | 3 | 20244 | 3306 | 263.17 | 79.34 |
| | 6 | 8614 | 1595 | 111.98 | 38.28 |
| | 10 | 7756 | 1532 | 100.83 | 36.77 |
| | 14 | 3429 | 717 | 44.58 | 17.21 |
| | 17 | 2655 | 647 | 34.52 | 15.53 |
| | 20 | 2242 | 540 | 29.15 | 12.96 |
| | 24 | 1638 | 384 | 21.29 | 9.22 |
| | 27 | 2439 | 576 | 31.71 | 13.82 |
| | 34 | 1001 | 195 | 13.01 | 4.68 |
| 41 | 968 | <20 | 12.58 | <0.48 | |
| 49 | 461 | 35 | 5.99 | 0.84 | |
| DCF1 | до иммунизации | <20 | <20 | <0.26 | <0.48 |
| | 3 | <20 | 2138 | <0.26 | 51.31 |
| | 6 | 29 | 1172 | 0.38 | 28.13 |
| | 10 | <20 | 133 | <0.26 | 3.19 |
| | 14 | 21 | 35 | 0.27 | 0.84 |
| | 17 | <20 | 30 | <0.26 | 0.72 |
| | 20 | 23 | 28 | 0.30 | 0.67 |
| 23 | <20 | 23 | <0.26 | 0.55 | |

| Титр ID ₅₀ | мкг/мл |
|-----------------------|----------|
| >6000 | >75 |
| >1000 - 5000 | >15 - 75 |
| >200 - 1000 | >5 - 15 |
| 40 - 200 | 1 - 5 |

Фиг. 13



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2