

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392367** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.01.19

(51) Int. Cl. **C07K 14/47** (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.02.18

**(54) ПОЛИПЕПТИДЫ, ИМИТИРУЮЩИЕ ЭПИТОПЫ МРЕР И V3-ПЕТЛИ
ГЛИКОПРОТЕИНА Env ВИЧ-1**

(31) **21159446.0**

(32) **2021.02.26**

(33) **EP**

(86) **PCT/CZ2022/050017**

(87) **WO 2022/179648 2022.09.01**

(71) Заявитель:
**УНИВЕРЗИТА ПАЛАЦКЕГО В
ОЛОМОУЦИ; НЕКСИУМ, С.Р.О.
(CZ)**

(72) Изобретатель:

**Мали Петр, Раска Милан, Кухар
Милан, Козтиу Петр, Церни
Йири, Даниель Лискова Вероника,
Петрокова Гана (CZ)**

(74) Представитель:

Нагорных И.М. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложены полипептиды, имеющие длину до 180 аминокислот и содержащие последовательность, выбираемую из числа последовательностей, идентичных следующей последовательности или отличающихся от нее не более чем 5 аминокислотами:

KSELAVEILEKGVRFWMQAX₁X₂X₃X₄GNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHDX₅X₆GHEM
FMEKLDQDEGTYTFQLOX₇X₈X₉X₁₀NHSTVVLVGDVFKLQKEAEFORQEWIRKOG (SEQ ID NO. 2).

где X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄ выбирают из KAQQ (SEQ ID NO: 33), LSVF (SEQ ID NO: 34), ATPS (SEQ ID NO: 35), EIMW (SEQ ID NO: 36), DGSS (SEQ ID NO: 37), LLPL (SEQ ID NO: 38), WMWW (SEQ ID NO: 39), MNLY (SEQ ID NO: 40), MWRN (SEQ ID NO: 41), IMME (SEQ ID NO: 42), KHQL (SEQ ID NO: 43), HWQF (SEQ ID NO: 44), YAGN (SEQ ID NO: 45) и HGQW (SEQ ID NO: 46); X₅₀X₅₁X₅₂ выбирают из RNT, IMF, GHE, PSW, RAN, YFW, ITL, QAM, DMR, WLW, QGE, VQY и VSL; X₇₆X₇₇X₇₈X₇₉X₈₀ выбирают из SHHLG (SEQ ID NO: 47), FMLMM (SEQ ID NO: 48), VILIL (SEQ ID NO: 49), IVTPL (SEQ ID NO: 50), DFIIW (SEQ ID NO: 51), MWSE (делеция) (SEQ ID NO: 52), LYYAW (SEQ ID NO: 53), MMIEY (SEQ ID NO: 54), WMTQT (SEQ ID NO: 55), PQLWL (SEQ ID NO: 56), EPIFL (SEQ ID NO: 57) и QTATY (SEQ ID NO: 58); и необязательно дополнительно имеющих аффинную метку, прикрепленную к N-концу или C-концу последовательности. Эти полипептиды имитируют эпитопы гликопротеина Env ВИЧ-1 и пригодны для получения антител и вакцин.

A1

202392367

202392367

A1

Полипептиды, имитирующие эпитопы MPER и V3-петли гликопротеина Env ВИЧ-1

Область техники

5 Настоящее изобретение относится к полипептидам, получаемым из структуры домена миомезин-1 сократительного белка человека. Полипептиды согласно настоящему изобретению включают три группы полипептидов, обозначенных как MLA, MLB и MLD, которые нацелены на
10 нейтрализующие антитела широкого спектра действия (bNAb) 10E8, PGT126 и PGT121 против вируса ВИЧ-1, соответственно. Эти полипептиды распознают паратоп конкретного bNAb к ВИЧ-1 и имитируют когнатные эпитопы гликопротеина Env и, следовательно, пригодны в качестве
иммуногенов для стимуляции продуцирования антител, нейтрализующих ВИЧ-1, и для разработки вакцины, предотвращающей ВИЧ-инфекцию.

Уровень техники

15 Стимуляция защитного иммунитета путем продуцирования нейтрализующих антител широкого спектра действия (bNAb) у иммунизированных людей остается сложной проблемой при разработке вакцины против ВИЧ-1. Идентификация и определение характеристик bNAb с высоким
20 иммуногенным потенциалом, клонированных из В-клеток элитных нейтрализаторов, дают молекулярную подсказку для разработки новых стратегий вакцинации. Основной мишенью нейтрализующего антитела на поверхности вируса ВИЧ-1 является оболочечный гликопротеин (Env) — гетеротример, состоящий из трех идентичных субъединиц gp120/gp41. Gp120 выступает
из поверхности вируса, тогда как gp41 является трансмембранной субъединицей. Систематические
25 исследования специфичности, аффинности связывания, ширины спектра действия и иммуногенного потенциала привели к кластеризации bNAb на четыре основные группы, специфичные для V2-петли гликопротеинов Env ВИЧ-1 (V2 bNAb), V3-гликана (V3 bNAb), сайта связывания CD4 (CD4 bNAb) и мембрано-проксимального внешнего региона (MPER bNAb) (Moore, P.L. The Neutralizing Antibody Response to the HIV-1 Env Protein. *Curr HIV Res* 16, 21-28, 2018). Некоторые из этих bNAb демонстрируют необычайные широту спектра действия и
30 иммуногенный потенциал и эффективно нейтрализуют вирусную инфекцию клеток-хозяев и являются отличными кандидатами для разработки вакцин и терапии (Sok, D., и Burton, D.R. Recent progress in broadly neutralizing antibodies to HIV. *Nat Immunol* 19, 1179-1188, 2018).

Для преодоления сохраняющихся проблем, связанных с низкоэффективной иммунизацией Env/gp120 и Env-модифицированными гликансодержащими иммуногенами мы недавно предложили новую стратегию, которая основана на иммунизации искусственными каркасными белками, имитирующими эпитоп Env ВИЧ-1 (Koszyu, P., Kuchar, M., Cerny, J., Barkocziova, L., Maly, M., Petrokova, H., Czernekova, L., Liskova, V., Raskova Kafkova, L., Knotigova, P., *et al.* Proteins mimicking epitope of HIV-1 virus neutralizing antibody induce virus-neutralizing sera in mice. *EBioMedicine* 47, 247-256, 2019). Эти варианты белка, выбранные путем направленной эволюции из комбинаторной библиотеки, полученной из очень сложного альбумин-связывающего домена, могут функционировать как «белковые отпечатки» паратопов bNAbs к ВИЧ-1 с наибольшим иммуногенным потенциалом. В нашем исследовании для подтверждения правильности концепции мы продемонстрировали, что варианты под названиями VRA017, VRA019 и VRA177, имитирующие эпитоп bNAbs VRC01, вызывали вируснейтрализующие сыворотки у мышей при тестировании на панели псевдотипированных вирусов ВИЧ-1 на репортерных клетках TZM-bl. Полипептиды VRA имитируют эпитоп основного сайта связывания CD4, необходимого для первоначального взаимодействия вируса ВИЧ-1 с мембраной клетки-хозяина, и вызывают антитела, нацеленные на субъединицу gp120. Однако для усиления эффективности нейтрализации все же желательно разработать более комплексный подход с получением полипептидов, которые вызывали бы антитела, блокирующие другие важные эпитопы gp41 и gp120 в гликопротеине оболочки ВИЧ-1 во избежание выхода вирусных мутантов из-под контроля иммунной системы.

20

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предложены полипептиды, упоминаемые в этом документе как MLA, пригодные для индуцирования образования вируснейтрализующих антител к ВИЧ-1, которые нацелены на «сверхкандидата» bNAbs 10E8, специфичного для MPER субъединицы gp41, выступающей из вирусной оболочки. В настоящем изобретении также предложены полипептиды, упоминаемые в этом документе как MLB и MLD, которые имитируют эпитопы V3-петли нейтрализующих антител PGT126 и PGT121, соответственно, с высоким иммуногенным потенциалом. Все полипептиды были получены из рандомизированной по петлям библиотеки каркасов, разработанной на структуре домена 10 сократительного мышечного белка человека миомезин-1. Когда новые полипептиды используют в качестве иммуногенов у экспериментальных мышей для стимуляции продуцирования специфических антител, специфичность к Env и вируснейтрализующая активность гипериммунных сывороток, тестируемых на панели

30

псевдотипированных вирусов ВИЧ-1 клад А, В, С, D и АЕ, приводят к нейтрализации большинства тестируемых псевдовирусов *in vitro*.

Последовательность родительского белка домена 10 миомезина-1 человека (PDB ID 6T3O) имеет следующий вид:

KSELAVEILEKGQVRFWMQA**EKLS**GNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHID**RNT**GIIEMFMEKLQD
EDEGTYTFQLQ**DGKAT**NHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 1)

Аминокислотные остатки в положениях 21–24, 50–52 и 76–80 были рандомизированы. Эти положения выделены жирным текстом в последовательности SEQ IN NO. 1.

Таким образом, в настоящем изобретении предложены полипептиды, имеющие длину до 180 аминокислот и содержащие последовательность, выбираемую из числа последовательностей, идентичных следующей последовательности или отличающихся от нее не более чем 5 аминокислотами:

KSELAVEILEKGQVRFWMQAX₂₁X₂₂X₂₃X₂₄GNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHIDX₅₀X₅₁
X₅₂GIIEMFMEKLQDEDEGTYTFQLQX₇₆X₇₇X₇₈X₇₉X₈₀NHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIR
KQG (SEQ ID NO. 2),

где

X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄ выбраны из KAQQ (SEQ ID NO. 33), LSVF (SEQ ID NO. 34), ATPS (SEQ ID NO. 35),
EIMW (SEQ ID NO. 36), DGSS (SEQ ID NO. 37), LLPL (SEQ ID NO. 38), WMWW (SEQ ID NO. 39),
MNLY (SEQ ID NO. 40), MWRN (SEQ ID NO. 41), IMME (SEQ ID NO. 42), KHQL (SEQ ID NO. 43),
HWQF (SEQ ID NO. 44), YAGN (SEQ ID NO. 45) и HGQW (SEQ ID NO. 46);

X₅₀X₅₁X₅₂ выбраны из RNT, IMF, GHE, PSW, RAN, YFW, ITL, QAM, DMR, WLW, QGE, VQY и VSL;

X₇₆X₇₇X₇₈X₇₉X₈₀ выбраны из SHHLG (SEQ ID NO. 47), FMLMM (SEQ ID NO. 48), VILIL (SEQ ID NO. 49),
IVTPL (SEQ ID NO. 50), DFIIW (SEQ ID NO. 51), MWSE(делеция) (SEQ ID NO. 52),
LYYAW (SEQ ID NO. 53), MMIEY (SEQ ID NO. 54), WMTQT (SEQ ID NO. 55), PQLWL (SEQ ID NO. 56),
EPIFL (SEQ ID NO. 57) и QTATY (SEQ ID NO. 58),

необязательно дополнительно имеющих аффинную метку, прикрепленную к N-концу или C-концу последовательности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предпочтительны следующие комбинации переменных в последовательности SEQ ID NO. 2:

X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄ выбраны из KAQQ (SEQ ID NO. 33), LSVF (SEQ ID NO. 34), ATPS (SEQ ID NO. 35), EIMW (SEQ ID NO. 36), DGSS (SEQ ID NO. 37), LLPL (SEQ ID NO. 38), WMWW (SEQ ID NO. 39) и MNLY (SEQ ID NO. 40);

X₅₀X₅₁X₅₂ выбраны из RNT, IMF, GHE, PSW, RAN, YFW, ITL и QAM;

- 5 X₇₆X₇₇X₇₈X₇₉X₈₀ в выбраны из SHHLG (SEQ ID NO. 47), FMLMM (SEQ ID NO. 48), VILIL (SEQ ID NO. 49), IVTPL (SEQ ID NO. 50), DFIIW (SEQ ID NO. 51), MWSE(делеция) (SEQ ID NO. 52), LYYAW (SEQ ID NO. 53) и MMIEY (SEQ ID NO. 54).

Далее в настоящем документе полипептиды, имеющих эти переменные, называются полипептидами MLA.

10

В некоторых вариантах осуществления изобретения предпочтительны следующие комбинации переменных в последовательности SEQ ID NO. 2:

X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄ выбраны из MWRN (SEQ ID NO. 41), IMME (SEQ ID NO. 42) и KHQL (SEQ ID NO. 43);

- 15 X₅₀X₅₁X₅₂ выбраны из RNT, DMR и WLW;

X₇₆X₇₇X₇₈X₇₉X₈₀ выбраны из IVTPL (SEQ ID NO. 50) и WMTQT (SEQ ID NO. 55).

Далее в настоящем документе полипептиды, имеющих эти переменные, называются полипептидами MLB.

- 20 В некоторых вариантах осуществления изобретения предпочтительны следующие комбинации переменных в последовательности SEQ ID NO. 2:

X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄ выбраны из HWQF (SEQ ID NO. 44), YAGN (SEQ ID NO. 45) и HGQW (SEQ ID NO. 46);

X₅₀X₅₁X₅₂ выбраны из QGE, VQY и VSL;

- 25 X₇₆X₇₇X₇₈X₇₉X₈₀ выбраны из PQLWL (SEQ ID NO. 56), EPIFL (SEQ ID NO. 57) и QTATY (SEQ ID NO. 58).

Далее в настоящем документе полипептиды, имеющих эти переменные, называются полипептидами MLD.

- 30 В частности, предпочтительные полипептиды согласно настоящему изобретению имеют длину до 180 аминокислот и содержат последовательность, выбираемую из числа последовательностей, идентичных следующим последовательностям или отличающихся от них не более чем 5 аминокислотами:

- KSELAVEILEKGQVRFWMQA**KAQQ**GNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHID**IMF**GIIEMFMEKLQD
EDEGTYTFQLQ**SHHL**GNHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 3)
- KSELAVEILEKGQVRFWMQA**LSV**FGNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHID**RNT**GIIEMFMEKLQD
EDEGTYTFQLQ**FMLMM**NHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 4)
- 5 KSELAVEILEKGQVRFWMQA**ATPS**GNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHID**GHE**GIIEMFMEKLQD
EDEGTYTFQLQ**VILIL**NHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 5)
- KSELAVEILEKGQVRFWMQA**EIMW**GNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHID**PSW**GIIEMFMEKLQ
DEDEGTYTFQLQ**IVTPL**NHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 6)
- KSELAVEILEKGQVRFWMQA**DGSS**GNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHID**RANG**IEMFMEKLQD
10 EDEGTYTFQLQ**DFI**WNHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 7)
- KSELAVEILEKGQVRFWMQA**ALLPL**GNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHID**YFW**GIIEMFMEKLQD
EDEGTYTFQLQ**MWSEN**HSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 8)
- KSELAVEILEKGQVRFWMQA**WMWW**GNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHID**ITL**GIIEMFMEKLQ
DEDEGTYTFQLQ**LYYA**WNHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 9)
- 15 KSELAVEILEKGQVRFWMQA**MNLY**GNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHID**QAM**GIIEMFMEKLQ
DEDEGTYTFQLQ**MMIE**YNHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 10)
- KSELAVEILEKGQVRFWMQA**MWRN**GNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHID**RNT**GIIEMFMEKLQ
DEDEGTYTFQLQ**WMTQT**NHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 11)
- KSELAVEILEKGQVRFWMQA**IMME**GNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHID**DMR**GIIEMFMEKLQ
20 DEDEGTYTFQLQ**IVTPL**NHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 12)
- KSELAVEILEKGQVRFWMQA**KHQL**GNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHID**DWLW**GIIEMFMEKLQ
DEDEGTYTFQLQ**IVTPL**NHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 13)
- KSELAVEILEKGQVRFWMQA**HWQF**GNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHID**QGE**GIIEMFMEKLQ
DEDEGTYTFQLQ**PQLWL**NHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 14)
- 25 KSELAVEILEKGQVRFWMQA**YAGN**GNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHID**VQY**GIIEMFMEKLQ
DEDEGTYTFQLQ**EPIFL**NHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 15) и
- KSELAVEILEKGQVRFWMQA**HGQW**GNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHID**VSLG**IEMFMEKLQ
DEDEGTYTFQLQ**QTATY**NHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 16),
необязательно дополнительно имеющих аффинную метку, прикрепленную к N-концу или C-концу
- 30 последовательности.

В некоторых вариантах осуществления последовательности согласно настоящему изобретению идентичны последовательности SEQ ID NO. 2 (с перечисленными переменными областями) или

последовательностям с SEQ ID NO. 3 по SEQ ID NO. 16, необязательно дополнительно имеющим аффинную метку, прикрепленную к N-концу или C-концу последовательности.

5 В некоторых вариантах осуществления последовательности согласно настоящему изобретению отличаются не более чем 5 аминокислотами от последовательности SEQ ID NO. 2 (с перечисленными переменными областями) или от последовательностей с SEQ ID NO. 3 по SEQ ID NO. 16, и необязательно дополнительно имеют аффинную метку, прикрепленную к N-концу или C-концу последовательности.

10 Выражение «отличающиеся не более чем 5 аминокислотами» или «отличается не более чем 5 аминокислотами» означает, что 1, или 2, или 3, или 4 или 5 аминокислот в последовательности заменены (замещены) другими аминокислотами.

15 Выражение «имеют длину до 180 аминокислот» означает, что последовательность SEQ ID NO. 2 (с перечисленными переменными областями) или последовательности с SEQ ID NO. 3 по SEQ ID NO. 16 могут быть удлинены на C-конце или N-конце либо на обоих концах в общем итоге не более чем 69 аминокислотами (или 70 аминокислотами). Предпочтительно длина полипептида может составлять до 160, или до 140, или до 120 аминокислот.

20 В настоящем изобретении было обнаружено, что полипептиды согласно настоящему изобретению преимущественно связываются с переменными областями нейтрализующих моноклональных антител к ВИЧ-1 широкого спектра действия 10E8 (полипептиды MLA), PGT126 (полипептиды MLB) и PGT121 (полипептиды MLD), что демонстрируется более высокой аффинностью связывания с этими bNAbs по сравнению с контрольным изотипом IgG и конкурентными анализами. На использование полипептидов может влиять комбинация начальной дозы иммунизации и дополнительных бустерных доз, при которых различные версии полипептидов благодаря существенному сходству формы поверхности могут значительно увеличивать продуцирование нейтрализующих антител, вырабатываемых против конкретного эпитопимитирующего иммуногена.

30 Аффинные метки обычно используют для очистки продуцируемых полипептидов, а затем они могут быть отщеплены или сохранены в последовательности. В число полипептидных меток могут входить, например: ALFA-tag, AviTag, C-tag, полиглутоматовая метка, полиаргининовая метка, E-

tag, FLAG-tag, HA-tag, His-tag, Myc-tag, NE-tag, Rho1D4-tag, S-tag, Softag1, Softag3, Spot-tag, Strep-tag, T7-tag, TC tag, Ty tag, V5 tag, VSV-tag, Xpress tag, Isopeptag, SpyTag, SnoopTag, Dog-Tag, SdyTag. Предпочтительными метками являются poly(his), FLAG, AviTag, HA, Myc, S-tag или V5-tag.

5

Полипептиды в настоящем изобретении пригодны для использования в фармацевтической технологии, особенно в качестве имитирующих рекомбинантных белковых лигандов, используемых для разработки более эффективной вакцины, предотвращающей вирусную инфекцию ВИЧ-1. С этой целью к указанным полипептидам согласно настоящему изобретению выгодно присоединять другие белки-помощники, которые могут стимулировать продуцирование антител, например, сывороточный альбумин или белок теплового шока hsp70. Эти белки-помощники могут быть ковалентно связаны с полипептидами с образованием химерного белка. Другие возможности заключаются в модификации упомянутых полипептидов путем прикрепления N- или C-концевых последовательностей-помощников (меток), которые делают возможными их специфическое обнаружение или их ориентированную иммобилизацию на поверхности носителей, таких как нанOLIпосомы, с повышением эффективности иммунизации. В число таких меток в предпочтительных вариантах осуществления входят аффинные метки или метки обнаружения poly(his), FLAG, AviTag, HA, Myc, S-tag или V5-tag.

20 Полипептиды согласно настоящему изобретению, определяемые аминокислотными последовательностями, стимулируют продуцирование сывороточных антител после использования для иммунизации экспериментальных животных. Гипериммунные сыворотки иммунизированных животных подавляли инфекцию репортерных клеток тестируемыми Env-псевдотипированными вирусами в модельной системе, и это представляет собой один из 25 ключевых механизмов борьбы с инфекцией ВИЧ-1 и одну из целей разработки профилактической вакцины, которой до сих пор нет на рынке.

Основным преимуществом этих полипептидов по сравнению с вакцинами, тестируемыми в настоящее время, является их комплексность имитирования трех различных эпитопов оболочки ВИЧ-1, находящихся на MPEP белка gp41 и V3-петле белка gp120. Это позволяет 30 нейтрализовывать ярко выраженные эпитопы, определяемые наиболее эффективными bNAbs к ВИЧ-1 — 10E8, PGT121 и PGT126. Одновременная выработка набора нейтрализующих антител хозяином предотвращает выход вирусных мутантов из-под контроля иммунной системы. Преимуществом этих полипептидов с практической точки зрения является простота их получения,

стабильность и отсутствие посттрансляционных модификаций, что позволяет легко получать их биотехнологическим путем в прокариотических клетках-хозяевах *Escherichia coli* и в дальнейшем использовать в качестве вакцинных антигенов.

5 В настоящем изобретении также предложена вакцина для профилактики вирусной инфекции ВИЧ-1, содержащая полипептид согласно настоящему изобретению и/или конъюгат согласно настоящему изобретению в качестве активного ингредиента или вспомогательного ингредиента. В некоторых вариантах осуществления вакцина может содержать по меньшей мере два полипептида согласно настоящему изобретению и/или по меньшей мере два конъюгата согласно настоящему
10 изобретению. Подходящие вспомогательные вещества для приготовления вакцин известны в данной области.

В настоящем изобретении также предложена последовательность ДНК, выбираемая из группы, содержащей комплементарную ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность
15 полипептидов согласно настоящему изобретению.

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

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Описание получения домена 10 миомезина-1 человека. А) Анализ белковых фракций
25 домена 10 миомезина-1 человека с использованием ДСН-ПААГ-электрофореза, фракций из гель-фильтрационной хроматографии на Superdex 75 10/300, М — маркер молекулярного веса. В) Термостабильность домена 10 миомезина-1 человека, измеренная методом «термофлуор», известным также как анализ теплового сдвига. Нормализованная кривая флуоресценции при термическом плавлении (сплошная линия) и первая производная кривой флуоресценции в
30 зависимости от температуры (пунктирная линия). Температура плавления указывается самой низкой точкой пунктирной кривой.

Фиг. 2. Домен 10 миомезина-1 человека, общее представление о библиотеке миомединов петлевого типа. А) Кристаллическая структура домена 10 миомезина-1, используемого для

рандомизации (PDB ID 6t3o), как часть структур более длинного фрагмента миомезина (PDB ID 2y23). Домен 10 показан с рандомизированными остатками, указанными в виде черных сфер. В) Домен 10 в повернутом виде показан в виде эскиза, на котором рандомизированные остатки указаны черными сферами.

5 **Фиг. 3. Связывание вариантов белка MLA с bNAbs 10E8, контрольным изотипом IgG и БСА.**

Варианты миомедина восьми селекционированных клонов MLA в виде очищенных слитых белков с N-концевой полигистидиновой меткой и C-концевой V5-меткой, полученных в *E. coli* BL21 (DE3), оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), а в качестве отрицательного контроля использовали родительский нерандомизированный миомедин.

10 Связывание с иммобилизованным bNAbs 10E8 (обозначенным как IgG 10E8), изотипом IgG1 λ (обозначенным как IgG-лямбда) и БСА обнаруживали с помощью антитела к V5, конъюгированного с пероксидазой хрена (ПОХ). Каждая показанная точка представляет собой среднее значение трех измерений со стандартным отклонением.

Фиг. 4. Иммунизация экспериментальных мышей панелью вариантов MLA индуцировала

15 **сывороточные антитела, специфически распознающие Env ВИЧ-1 на поверхности вируса.** А)

Мышей иммунизировали путем введения четырех доз отдельных вариантов MLA, включая дикий тип (Mu0WT). Сыворотки собирали и тестированы на их реактивность с нерепликативными вирусами ВИЧ-1, псевдотипированными с помощью В) клады С Env (ZM109F) или С) клады В Env (AC10.0, QH0692, RHPA), нанесенных на планшетах для ELISA. Выполняли статическое сравнение с помощью критерия Крускала-Уоллиса ANOVA с ретроспективным анализом с использованием критерия Данна (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$). Красной звездочкой указано сравнение с Mu0WT. D) Сыворотки мышей, иммунизированных миомединами MLA092 и MLA025, тестировали на реактивность с RHPA-псевдотипированным вирусом, нанесенным на панель ELISA, в конкуренции с 10E8 или VRC01.

25 **Фиг. 5. Титрование нейтрализации сывороток мышей, иммунизированных MLA.**

Выполняли анализы нейтрализации с использованием набора псевдовирюсов клад А, В, С, АЕ и D ВИЧ-1 уровня 2 или 3 с индикаторными клетками TZM-bl. Последовательно разведенные образцы сыворотки в двух экземплярах инкубировали с псевдовирюсами. После инкубации псевдовирюса с сывороткой добавляли клетки TZM-bl при плотности 10⁵ клеток/мл, инкубировали, лизировали и после добавления субстрата измеряли люминесценцию.

30 **Фиг. 6. Некорневое филогенетическое дерево из 194 репрезентативных последовательностей из каталога ВИЧ-1 2019 (HIV-1 2019 Compendium) генов ENV ВИЧ-1 (<https://www.hiv.lanl.gov>), пополненное 22 последовательностями ENV ВИЧ-1,**

используемыми в этом анализе. Штаммы ВИЧ-1 подразделяются на четыре группы М, N, O и P. Основную группу М дополнительно разбивают на девять генетически различных подтипов А, В, С, D, AE, G, H, J, F и К. Каждый подтип содержит гибридные вирусы — циркулирующие рекомбинантные формы в результате комбинирования генетического материала. Чтобы было
5 проще ориентироваться, изображены только 22 последовательности ENV ВИЧ-1, используемые в анализе.

Фиг. 7. Связывание вариантов белка MLB с bNAbs PGT126, контрольным изотипом IgG и БСА.

Три селекционированных клон MLB анализировали методом ELISA. Каждая показанная точка
10 представляет собой среднее значение двух измерений со стандартным отклонением.

Фиг. 8. Связывание вариантов белка MLD с bNAbs PGT121, контрольным изотипом IgG и БСА.

Три селекционированных клон MLD анализировали методом ELISA. Каждая показанная точка
представляет собой среднее значение двух измерений со стандартным отклонением.

**Фиг. 9. Конкуренция вариантов белков MLB и MLD с гликопротеином gp120 оболочки ВИЧ-1 за связывание с bNAbs PGT126 или PGT121b при анализе методом ELISA. Их связывание с bNAbs PGT121 или PGT126, соответственно, визуализировали с помощью конъюгата антитела anti-Flag M2 с ПОХ или, в случае биотинилированного белка, с помощью стрепавидина-ПОХ. Каждая показанная точка представляет собой среднее значение трех измерений со стандартным
20 отклонением.**

**Фиг. 10. Иммунизация экспериментальных мышей панелью вариантов MLB индуцировала сывороточные антитела, специфически распознающие Env ВИЧ-1. Сыворотки собирали и тестировали на их реактивность с мультимеризующимся gp120 консенсусной клады В ВИЧ-1, нанесенным на планшетах ELISA. Титры антител изотипа IgG измеряли методом ELISA.
25 Выполняли статическое сравнение с помощью критерия Крускала-Уоллиса ANOVA с ретроспективным анализом с использованием критерия Данна (* P<0,05).**

Фиг. 11. Связывание сывороток мышей, иммунизированных вариантами MLB, с мультимерным gp120 ВИЧ-1 специфически ингибируется антителами PGT126.

30 Примеры осуществления изобретения

В последующем тексте полипептиды согласно изобретению, полученные из домена 10 миомезина-1 человека, называются миомединами.

Материалы и способы

Получение домена 10 миомезина-1 человека

Мы получили домен 10 белка миомезин-1 (MYOM1) в *E. coli* с N-концевой 6xHis-меткой и сайтом расщепления тромбином. Белок очищали с помощью агарозы Ni-NTA и эксклюзионной хроматографии, а его рентгеновскую структуру определяли с разрешением 1,8 Å. Идентифицированную структуру депонировали в банк данных белков (Protein Data Bank, PDB) под инвентарным кодом (PDB ID) 6t3o. От компании Source BioScience (Ноттингем, Великобритания) получили матричную ДНК, соответствующую GenBank BC116183. Домен 10 миомезина амплифицировали с помощью пары праймеров (прямой Myom10-F CATATGAAATCAGAGTTGGCAGTTGAAAT, SEQ ID NO. 17, обратный Myom10-R CAAGAATGGATCAGGAAACAAGGTTAAGGATCC, SEQ ID NO. 18), вставляя сайты рестрикции NdeI и BamHI, которые затем использовали для лигирования конструкции в вектор pET28b. Конечный белковый продукт содержит 6xHis-метку и сайт расщепления тромбином на N-концах. Миомезин получали в клетках *E. coli* BL21 (λDE3). Клетки выращивали при температуре 37 °C до оптической плотности OD₆₀₀, равной 0,6, в лизогенном бульоне (LB), затем индуцировали экспрессию белка с помощью 1 мМ изопропилтиогалактозида (IPTG) и продолжали культивирование в течение еще 4 часов, после чего собирали клетки путем центрифугирования. Белок очищали с использованием агарозы Ni-NTA (Qiagen, Германия) в нативных условиях. Элюированные белковые фракции объединяли, концентрировали и наносили на колонку Superdex 75 10/300 GL для эксклюзионной хроматографии (GE Healthcare, Великобритания) с электродным трис-буфером 20 мМ трис, 50 мМ NaCl, pH 8,0. Как показано на Фиг. 1А, полученный белок, проанализированный с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза, соответствует ожидаемой молекулярной массе 16 кДа.

25

Анализ теплового сдвига

В образцы белка (0,1 мг/мл) добавляли краситель Sypro Orange (Sigma Aldrich) в 5-кратной концентрации с получением общего объема 25 мкл. С использованием работающего в режиме реального времени амплификатора CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories) белки инкубировали с температурным градиентом от 20 °C до 80 °C с шагом 0,5 °C и 30-секундными интервалами выдержки. Степень развертывания белка контролировали с помощью канала резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET), который фиксировал спектральные свойства комплексов из красителя и развернутых белковых комплексов (возбуждающая длина волны

30

≈470 нм и эмиссионная длина волны ≈570 нм). Данные анализировали с использованием программного обеспечения CFX, и с помощью производного спектра первого порядка определяли температуры плавления. Как показано на Фиг. 1В, идентифицированная температура плавления (T_m) соответствует T_m 72°C. Это свидетельствует о том, что домен 10 миомезина-1 сохраняет конформацию и стабильность структуры даже в том случае, когда он отделен от структурного контекста миомезинового филамента.

Дизайн комбинаторной библиотеки, основанной на каркасе домена миомезина-1 человека

10 Кристаллическая структура домена 10 миомезина-1 (PDB ID 6t3o) образована 111 аминокислотами, которые составляют 2-слойный сэндвич иммуноглобулиноподобного домена с 7 антипараллельными β-нитями и концевой α-спиралью (Фиг. 2А, В). Домен соответствует части MY10 связывающего миомезиновый филамент белка миомезин-1 (PDB ID 2y23) с идентичностью 100%. Чтобы выбрать остатки миомезина, пригодные для рандомизации, мы выполнили *in silico* скрининг способности к мутированию всех аминокислотных остатков. Мы использовали кристаллическую структуру домена 10 миомезина-1 человека (PDB ID 6t3o) и с помощью всех остатков подвергли мутации все 20 аминокислот, используя процедуру PosityScan программы FoldX. В соответствии с предсказанным изменением свободной энергии при мутации мы присвоили каждому остатку оценку способности к мутированию, соответствующую нескольким стабилизирующим заменам. 15
20
25

Оценку использовали для окончательного выбора потенциально пригодных остатков в попытке найти непрерывный участок доступных поверхностных остатков с высокой способностью к мутированию. Эта процедура привела к выбору следующих остатков, локализованных в петлевых областях домена 10 миомезина: E1267, K1268, L1269, S1270, R1296, N1297, T1298, D1322, G1323, K1324, A1325 и T1326, пронумерованных в соответствии с записью P52179 в базе данных UniProt. Остатки, выбранные для рандомизации, показаны на Фиг. 2В.

Построение библиотеки миомединов

Комбинаторную библиотеку миомединов собирали посредством последовательности из трех ПЦР с использованием ДНК-полимеразы для высокого разрешения Phusion (NEB, Массачусетс, США) с применением списка праймеров и адаптеров (см. таблицу 1 ниже). 1-я ПЦР (температура отжига 65 °С, 10 циклов) со 100 мкМ олигонуклеотидов MYOM-LP_n1F, MYOM-LP_2F и MYOM-LP_n2R дала в результате продукт из 147 н. п., который использовали во 2-й ПЦР (температура отжига 59 °С, 10 циклов) с 10 мкМ олигонуклеотидов MYOM-LP_1F и MYOM-LP_3R. Для завершения

последовательности миомедина (333 п. о.) использовали 3-ю ПЦР с 10 мкМ олигонуклеотидов L-for и L-rev. Кроме того, использовали две дополнительные ПЦР: 4-ю ПЦР с праймерами JOIN-F (добавление сайта связывания рибосомы, RBS) и JOIN-R и, наконец, 5-ю ПЦР с праймерами T7B (добавление промотора T7) и TolAk, соединяющим миомедин и спейсер TolA (штамм *E. coli* K-12).

- 5 Матрицу спейсера TolA для 5-й ПЦР амплифицировали с использованием праймеров P7 link и TolA rev из выделенной генетической ДНК *E. coli*. Получающийся в результате продукт ПЦР, представляющий линейный вектор для *in vitro* транскрипции и трансляции (5'-T7 промотор-5' шпилька-RBS-миомедин-TolAk-3' шпилька-3'), экстрагировали из агарозного геля и очищали.

- 10 **Таблица 1.** Список олигонуклеотидов для сборки комбинаторной библиотеки и рибосомного дисплея. Тринуклеотидную смесь из 19 аминокислотных кодонов (Ella Biotech GmbH, Мартинсрид, Германия) использовали для синтеза рандомизированных положений (выделены жирным шрифтом) кодирующей нити ДНК (X01) и комплементарной нити ДНК (R01).

MYOM-LP_n1F	AATGCCAAAGTGAACATATCTTCAACGAGAAAGAAATCTTCGAAGGTCCGAAATACAAAA TGCATATTG (SEQ ID NO. 19)
MYOM-LP_2F	GGTCCGAAATACAAAATGCATATTGAT X01X01X01 GGCATCATCGAAATGTTTATGG (SEQ ID NO. 20)
MYOM-LP_n2R	CAGCTGAAAGGTATAGGTGCCTTCATCTTCATCCTGCAGTTTTTCCATAAACATTTTCGATGA TGCC (SEQ ID NO. 21)
MYOM-LP_1F	TCGTTTTTGGATGCAGGCAX X01X01X01X01 GGTAATGCCAAAGTGAACATATCTTC (SEQ ID NO. 22)
MYOM-LP_3R	CCAGAACAACGGTTGAATGATT R01R01R01R01R01 CTGCAGCTGAAAGGTATAGGTGC (SEQ ID NO. 23)
L-for	AAAAGCGAGCTGGCCGTGGAAATTCTGGAAAAAGGTCAGGTTCTTTTTGGATGCAGGCA (SEQ ID NO. 24)
L-rev	ACCCTGTTTACGAATCCATTCTTGGCGCTGAAATTCTGCTCTTTTTGCAGTTTTTGAACAC GTCACCAACCAGAACAACGGTTGAATGATT (SEQ ID NO. 25)
JOIN-F	CTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGAT ATACATATGAAAAGCGAGCTGGCCG (SEQ ID NO. 26)
JOIN-R	GAACCGACCGCGGATCCACCCTGTTTACGAATCCATTCTT (SEQ ID NO. 27)
T7B	ATACGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGG (SEQ ID NO. 28)
TolAk	CCGCACACCAGTAAGGTGTGCGGTTTCAGTTGCCGCTTCTTTCT (SEQ ID NO. 29)
P7 link	GGATCCGCGGTTCGTTTCGA (SEQ ID NO. 30)
TolA rev	TTTCCGCTCGAGCTACGGTTTGAAGTCCAATGGCGC (SEQ ID NO. 31)
His-Myo-F	CAGTCCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCAAAAGCGAGCTGGCC G (SEQ ID NO. 32)

Антитела, использованные для селекции.

Нейтрализующие моноклональные антитела широкого спектра действия против Env ВИЧ-1 человека 10E8, PGT121, и PGT126 получали в рамках программы NIH AIDS Reagent Program (Division of AIDS, NIAID, NIH, Джермантаун, Мэриленд). 10E8, PGT121 или PGT126 IgG

5 использовали в качестве белка-мишени для рибосомного дисплея и в приложениях ELISA (хранили в виде поделенного на аликвоты 1 мг/мл исходного маточного материала при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$). В качестве изотипического контроля для предварительной селекции библиотеки методом рибосомного дисплея и в качестве отрицательного контроля для ELISA был

10 выбран человеческий IgG1 с легкой цепью κ или λ (легкую цепь использовали в качестве комплементарной к тестируемому bNAb, очищенному белку миеломы, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) (хранили в виде поделенного на аликвоты 1 мг/мл исходного маточного материала при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Селекция методом рибосомного дисплея

15 Комбинаторную библиотеку миомединов использовали для *in vitro* транскрипции/трансляции и дальнейшей селекции методом рибосомного дисплея (RD). Выполняли трехраундовые селекции методом RD, 96-луночные планшеты Polysorp (NUNC, Дания) покрывали IgG1 10E8, разбавленным в 100 мМ растворе бикарбоната/карбоната (pH 9,6) в концентрации в соответствии со скорректированной жесткостью в каждом раунде процедуры селекция RD: 1-й раунд —

20 25 мкг/мл, 2-й раунд — 10 мкг/мл и 3-й раунд — 10 мкг/мл. Процедуру предварительной селекции выполняли в лунках, покрытых антителом IgG1-лямбда человека при постоянной концентрации 25 мкг/мл в каждом раунде. Итоговую кДНК после третьего раунда селекции амплифицировали посредством ПЦР с праймерами His-Myo-F и JOIN-R. Расщепленный продукт ПЦР (NcoI, BamHI)

25 вводили в вектор pET-28b, содержащий последовательность V5-метки ниже по ходу кДНК миомедина и клонировали в клетках-хозяевах *E. coli* XL1-Blue. Тот же способ использовали для селекции белков, связывающихся с IgG PGT121 и PGT126.

Получение вариантов миомедина

30 Варианты белка миомедина, обозначенные как MLA, MLB и MLD (см. таблицу 2), получали в виде рекомбинантных белков массой 16 кДа с N-концевой меткой His6 и C-концевой меткой V5 (His6-миомедин-V5) в штамме *E. coli* BL21 (DE3) в среде LB, содержащей канамицин (60 мкг/мл). Продукцию белка индуцировали 1 мМ IPTG после достижения культурой оптической плотности $\text{OD}_{600} = 0,6$, затем клетки продолжали культивировать при встряхивании с частотой

250 об/мин и температуре 25 °С в течение 4 часов после индукции. Собранные клетки обрабатывали ультразвуком в TN-буфере (50 мм трис, 150 мм NaCl, pH 8,0), центрифугировали (40 000×g, 20 мин, 4 °С) и затем анализировали бактериальные лизаты или очищали белок на колонке с агарозой Ni-NTA.

5

Таблица 2. Таблица последовательностей MLA, MLB и MLD. Сравнение последовательностей вариантов белка с родительским нерандомизированным белком MyoWT. Серыми прямоугольниками указаны участки петли с 12 положениями, в которых были рандомизированы остатки MyoWT. Другие остатки каркасного белка миомезина из 111 аминокислот не были мутированы во всех показанных связывающих белках.

10

	L1				L2			L3				SEQ ID NO.			
	21	22	23	24	50	51	52	76	77	78	79		80		
MyoWT	E	K	L	S	...	R	N	T	...	D	G	K	A	T	1, 59, 60
MLA016	K	A	Q	Q	...	I	M	F	...	S	H	H	L	G	3, 33, 47
MLA024	L	S	V	F	...	R	N	T	...	F	M	L	M	M	4, 34, 48
MLA025	A	T	P	S	...	G	H	E	...	V	I	L	I	L	5, 35, 49
MLA092	E	I	M	W	...	P	S	W	...	I	V	T	P	L	6, 36, 50
MLA093	D	G	S	S	...	R	A	N	...	D	F	I	I	W	7, 37, 51
MLA132	L	L	P	L	...	Y	F	W	...	M	W	S	E	-	8, 38, 52
MLA158	W	M	W	W	...	I	T	L	...	L	Y	Y	A	W	9, 39, 53
MLA159	M	N	L	Y	...	Q	A	M	...	M	M	I	E	Y	10, 40, 54
MLB036	M	W	R	N	...	R	N	T	...	W	M	T	Q	T	11, 41, 55
MLB041	I	M	M	E	...	D	M	R	...	I	V	T	P	L	12, 42, 50
MLB049	K	H	Q	L	...	W	L	W	...	I	V	T	P	L	13, 43, 50
MLD033	H	W	Q	F	...	Q	G	E	...	P	Q	L	W	L	14, 44, 56
MLD068	Y	A	G	N	...	V	Q	Y	...	E	P	I	F	L	15, 45, 57
MLD108	H	G	Q	W	...	V	S	L	...	Q	T	A	T	Y	16, 46, 58

ELISA

Клеточные лизаты клонов *E. coli*, продуцирующих белок миомедин, получали с использованием ультразвукового гомогенизатора (Misonix 3000). Планшет Polysorp (NUNC) покрывали IgG 10E8, PGT121 или PGT126 (5 мкг/мл) или IgG1-лямбда (5 мкг/мл) в буфере для сенсibilизации поверхностей (100 мМ раствора бикарбонат/карбонат, pH 9,6) и оставляли на ночь при температуре 7 °С. На следующий день планшеты промывали раствором ФСБТ (фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,05% твина, pH 7,4), и лунки блокировали раствором ФСБТБ (фосфатно-солевой буфер, pH 7,4, содержащий 0,05% твина и 1% БСА). Наносили варианты очищенного

20

белка образцов лизата (разбавленные 33×), а также отрицательный контроль миомедина дикого типа, разбавленный в ФСБТБ. Связывание вариантом миомедина обнаруживали с использованием конъюгата антитела к V5 и ПОХ в ФСБТБ (1:10 000, Abscam, Кембридж, Великобритания). Результаты визуализировали с использованием ферментативной реакции ПОХ с субстратом TMB-Complete 2 (TestLine Clinical Diagnostics s. r. o., Брно, Чешская Республика), останавливали реакцию с помощью 2 М серной кислоты и измеряли поглощающую способность при 450 нм.

Варианты миомедина индуцируют сывороточные антитела, распознающие гликопротеины Env на псевдотипированных вирусах ВИЧ-1.

10 Восемь вариантов белка MLA 016, 024, 025, 092, 093, 132, 158 и 159 экспрессировали и очищали как рекомбинантные белки и использовали для иммунизации экспериментальных мышей внутрикожно с адьювантом Фрейнда четырьмя последовательными инъекциям антигена согласно расписанию, представленному на Фиг. 4А. Оценивали MPER-специфическую реакцию на псевдовирусах, нанесенных на панель ELISA, поскольку для эпитопа MPER необходимо наличие

15 мембраны, окружающей gp41. Методом ELISA оценивали четыре псевдовируса — один Env клады С (ZM109F) (Фиг. 4В) и три Env клады В Env (AC10.0, QH0692, RHPA) (Фиг. 4С). Эксперимент выявил значительно связывание для MLA 025, 092, 093, 158 и 159 по меньшей мере с одним псевдотипированным вирусом (Фиг. 4В, С) при сравнении с миомедином дикого типа (MuоWT). MuоWT не вызвал обнаруживаемого ответа сыворотки, специфичного к Env-псевдовirusу.

20 Для дальнейшего подтверждения MPER-специфичности связывания сывороток мы выполнили конкурентный анализ методом ELISA, при котором связывание сывороток с селекционированными псевдовирусами из клады В (в данном случае RHPA) конкурировало с последовательным разбавлением 10E8 в качестве исходной специфической мишени, используемой для селекции всех вариантов MLA (Фиг. 4D). Антитела 10E8 в концентрации 2 мкг/мл полностью

25 ингибировали реактивность всех тестируемых гипериммунных сывороток. Когда для конкуренции использовали нерелевантное bNAб (в данном случае VRC01), конкуренция не наблюдалась даже при концентрации 3,33 мкг/мл. В качестве отрицательных контролей тестировали интактные сыворотки и сыворотки мышей, иммунизированных миомедином дикого типа, с применением того же самого анализа, и никакого связывания сывороток с RHPA не наблюдалось независимо от

30 титрования 10E8 в качестве конкурента (Фиг. 4D). Антитела 10E8, последовательно разбавленные до достижения конечных концентраций 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 и 0 мкг/мл в блокирующем буфере, наносили с отдельными сыворотками мышей, иммунизированных MLA092 или MLA025, разбавленными в соотношении 1:400. После промывания планшеты инкубировали с кроличьим

антителом к мышиному IgG, конъюгированным с ПОХ, проявляли субстратом и измеряли оптическую плотность при 492 нм. Антитело VRC01 применяли в контрольной реакции в качестве нерелевантного антитела в конечной концентрации 3,33; 1; 0,33; 0,1; 0,033 и 0 мкг/мл аналогично 10E8. В отдельном эксперименте в качестве контроля применяли 10E8 в указанной концентрации с разбавленными в соотношении 1:400 сыворотками иммунизированных MyoWT или наивных мышей. Все эксперименты проводили в трех экземплярах. Средние значения указаны горизонтальными линиями.

Иммунизация экспериментальных мышей

Для всех экспериментов по иммунизации использовали самок мышей BALB/c в возрасте 6–8 недель, массой 18–22 г (AnLab, Брно, Чешская Республика). Животных содержали в стандартных условиях согласно рекомендациям ARRIVE. Эксперименты по иммунизации были одобрены комитетом по этике факультета медицины и стоматологии (Университет Палацкого, Оломоуц, Чешская Республика) и Министерством образования, молодежи и спорта Чешской Республики (MSMT-9487/2019-3). Всех мышей иммунизировали четыре раза. Перед первой иммунизацией отбирали предиммунные (наивные) сыворотки. Все иммунизации проводили внутривенно равной дозой 10 мкг отдельного варианта миомедина (разведенного в 50 мкл фосфатно-солевого буфера Дульбекко, ФСБД), смешанного с 50 мкл адьюванта Фрейнда (Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) на мышью за одну иммунизацию.

20

Титрование нейтрализации сывороток мышей, иммунизированных MLA.

Мышей иммунизировали путем введения четырех доз отдельных вариантов MLA, включая дикий тип (MyoWT). Каждая группа состояла из пяти животных. Выполняли анализы нейтрализации с использованием набора псевдовирусов клад А, В, С, АЕ и D ВИЧ-1 уровня 2 или 3 с индикаторными клетками TZM-bl. Последовательно разведенные образцы сыворотки в двух экземплярах инкубировали с псевдовирусами. Нагрузку псевдовирусами устанавливали таким образом, чтобы достичь примерно 150 000 ОСЕ в 150 мкл DMEM в отсутствие сывороток. После инкубации псевдовируса с сывороткой добавляли клетки TZM-bl при плотности 10⁵ клеток/мл, инкубировали, лизировали и после добавления субстрата измеряли люминесценцию. Результаты показаны на Фиг. 5. 22 последовательности ENV ВИЧ-1, использованные в анализе, наглядно представлены на Фиг. 6.

30

Определение связывающих антител, специфичных к Env ВИЧ-1

Реактивность связывающих антител, нацеленных на Env, измеряли методом ELISA с

использованием псевдотипированных вирусов, полученных для анализа нейтрализации вируса (полипептидов MLA, см. ниже) или рекомбинантных мультимеризующихся полипептидов консенсусной кланды В ВИЧ-1 (MLB и MLD). Чтобы удалить фетальную бычью сыворотку, псевдотипированные вирусы сначала обрабатывали в ультрацентрифуге в течение 3 часов при 5 50 000 g и температуре 4 °C и повторно суспендировали в ФСБ. Планшеты MaxiSorp для ELISA (NUNC, Роскилле, Дания) покрывали псевдотипированными вирусами, разбавленными в ФСБ, и оставляли на ночь при температуре 4 °C. Нанесение рекомбинантного gp120 проводили в тех же условиях. Планшеты промывали ФСБ и блокировали 1%-м раствором БСА/ФСБ в течение 3 часов при комнатной температуре. Мышинные сыворотки в двух экземплярах последовательно 10 разбавляли в блокирующем буфере и инкубировали в течение ночи при температуре 4 °C. Планшеты промывали ФСБ, и определяли связывающие антитела, нацеленные на Env, путем инкубирования в течение 3 часов с вторичным антителом против мышиного IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена, разбавленным в блокирующем буфере. Пластины промывали, и сигнал проявляли субстратом О-фенилендиамин-Н₂O₂. Реакцию останавливали с 15 помощью 1 М серной кислоты. Количественно определяли поглощающую способность при 492 нм с помощью устройства для считывания планшетов ELISA.

Конкурентный ELISA

Планшеты покрывали селекционированным вирусом ВИЧ-1 или рекомбинантным мультимеризующимся белком gp120 ВИЧ-1, как описано в предыдущем способе определения Env-специфичных связывающих антител. Антитела 10E8, PGT126 или PGT121 последовательно 20 разбавляли в блокирующем буфере и наносили в паре с мышиными гипериммунными сыворотками, разбавленными соответствующим образом. Планшеты промывали, и связывающие мышиные антитела обнаруживали с помощью вторичного антитела против мышиного IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена, разбавленного в блокирующем буфере. Сигнал 25 проявляли и измеряли, как описано выше.

Получение вируса

Псевдотипированные вирусы получали с использованием клеточной линии HEK293/17, 30 выращиваемой на площади 75 см² при 60–80%-й заселенности, совместно трансфицированной с 4 мкг плазмиды, кодирующей Env, и 8 мкг плазмиды, кодирующей pSG3deltaEnv, смешанной с 48 мкл реагента для трансфекции FuGene6 (Promega, Мэдисон, Висконсин, США) в 12 мл культуральной среды. Через 2 дня полученные псевдотипированные вирусы в культуральной

	AG280	35	31	<	35	<	<	<	32	<	<
	QG984.21M.A3	<	<	35	<	<	33	38	<	<	<
	AG250	33	<	<	<	<	<	37	<	<	<
	AG251	<	<	<	43	<	<	46	<	<	<
	QB726.70M.C4	<	<	38	<	<	<	<	<	<	<
	QH359.21M.E2	34	<	45	42	<	36	38	<	<	<
	QF495.23M.A1	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
	AG928	<	<	<	34	<	35	<	34	<	<
	QH343.21M.B5	<	<	<	32	44	57	<	<	<	<
	AC.10.0	<	<	30	56	<	59	92	78	<	<
	QH0692	<	<	45	57	<	40	75	53	<	<
B	pREJO	33	<	60	<	<	<	<	<	<	<
	1006	<	<	<	42	<	35	<	<	<	<
	TRO	45	<	<	<	<	<	42	<	<	<
	ZM197	<	<	<	44	<	<	63	43	<	<
	ZM214	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
C	ZM109	52	47	72	52	<	37	38	<	<	<
	Du172	58	37	62	74	<	57	60	<	<	<
	16936	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
D	QG393.60M.B7	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
CTRL	MULV	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
	Относительное среднее значение нейтрализации при разбавл.	41	38	47	45	44	42	52	48		
	К-во нейтрализованных ПВ	7	3	9	12	1	10	10	5		

Таблица 4. Нейтрализующая активность сывороток мышей, иммунизированных MLB и MLD. Значения представляют кратность разбавления сывороток, которая приводила к 50%-й нейтрализации вирусов. «Относительное среднее значение нейтрализации при разбавл.»

представляет средние значения обнаруженных титров среди всех тестируемых псевдовирусов. «К-во нейтрализованных ПВ» указывает суммарное количество псевдовирусов, нейтрализованных при реципрокном титре выше 30. В качестве контроля в анализе нейтрализации использовали вирус мышинного лейкоза (MULV). Псевдотипированные вирусы, использованные для анализа, выбирали таким образом, чтобы охватить филогенетическое дерево Env ВИЧ-1.

		Кратность разбавления сывороток, приводящая к 50%-й нейтрализации вирусов								
Клада	Псевдовир	MLB-PGT126			MLD-PGT121			Дикого типа	Наивный	
		036	041	049	033	068	108			
AE	CNE55	<	<	<	<	<	<	<	<	
	398F1	<	35	<	<	<	<	<	<	
	AG280	35	42	38	<	<	39	<	<	
	QG984.21M.A3	31	33	<	<	<	<	<	<	
	AG250	<	<	<	<	<	<	<	<	
	AG251	<	<	<	<	<	<	<	<	
	QB726.70M.C4	<	<	<	<	<	<	<	<	
	QH359.21M.E2	37	45	33	<	<	35	<	<	
	QF495.23M.A1	43	49	45	<	<	38	<	<	
	AG928	<	<	<	<	<	<	<	<	
QH343.21M.B5	38	<	<	<	<	32	<	<		
B	AC.10.0	<	<	<	<	<	<	<	<	
	QH0692	<	45	42	<	<	35	<	<	
	pREJO	38	53	<	<	<	37	<	<	
	6535	41	<	32	<	<	<	<	<	
	TRO	31	35	34	<	<	34	<	<	
C	ZM197	<	<	<	<	<	<	<	<	
	ZM214	<	<	<	<	<	<	<	<	
	ZM109	33	<	32	<	33	38	<	<	
	Du172	<	<	<	<	<	<	<	<	
	16936	51	<	33	<	31	35	<	<	
D	QG393.60M.B7	<	<	<	<	<	<	<	<	
CTRL	MULV	<	<	<	<	<	<	<	<	
Относительное среднее значение нейтрализации при разбавл.		37,8	42,1	36,1	30	32	35,8			
К-во нейтрализованных ПВ		10	8	8	0	2	9			

Связывание вариантов белка MLB с нейтрализующим антителом широкого спектра действия PGT126.

5

Три селекционированных клон MLB 036, 041 и 049 в виде очищенных слитых белков с N-концевой полигистидиновой меткой и C-концевой V5-меткой, полученных в *E. coli* BL21 (DE3), оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), а в качестве отрицательного контроля использовали родительский нерандомизированный миомедин.

10 Связывание с иммобилизованным bNAb PGT126 (обозначенным как IgG PGT126), изотипом IgG1 λ (обозначенным как IgG-лямбда) и БСА обнаруживали с помощью антитела к V5, конъюгированного с пероксидазой хрена (ПОХ). Каждая показанная точка представляет собой среднее значение двух измерений со стандартным отклонением. Результаты представлены на Фиг. 7.

15

Связывание вариантов белка MLD с нейтрализующим антителом широкого спектра действия PGT121.

Селекционированные клоны MLD 108, 033 и 068 в виде очищенных слитых белков с N-концевой полигистидиновой меткой и C-концевой V5-меткой, полученных в *E. coli* BL21 (DE3), оценивали

20 методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), а в качестве отрицательного контроля использовали родительский нерандомизированный миомедин. Связывание с иммобилизованным bNAb PGT121 (обозначенным как IgG PGT121), изотипом IgG1 λ (обозначенным как IgG-лямбда) и БСА обнаруживали с помощью антитела к V5, конъюгированного с пероксидазой хрена (ПОХ). Каждая показанная точка представляет собой

25 среднее значение двух измерений со стандартным отклонением. Результаты продемонстрированы на Фиг. 8.

Конкуренция вариантов белков MLB и MLD с гликопротеином gp120 оболочки ВИЧ-1 за связывание с bNAb PGT126 или PGT121b при анализе методом ELISA.

30 Варианты белка MLB036, MLB041, MLD033, MLD108 (His6-Myo-Flag) получали в *E. coli* BL21, а *in vivo* биотинилированные варианты MLD068 и MLD049 (His6-Myo-Avi) — в штамме *E. coli* BL21 BirA. Белки очищали с использованием агарозы Ni-NTA и анализировали методом ELISA. Увеличение концентрации gp120 ингибирует связывание белков MLB и MLD при постоянной

концентрации мкМ с bnAb. Их связывание с bnAb PGT121 или PGT126, соответственно, визуализировали с помощью конъюгата антитела anti-Flag M2 с ПОХ или, в случае биотинилированного белка, с помощью стрепавидина-ПОХ. Каждая показанная точка представляет собой среднее значение трех измерений со стандартным отклонением. Результаты представлены на Фиг. 9.

Иммунизация экспериментальных мышей панелью вариантов MLB индуцировала сывороточные антитела, специфически распознающие Env ВИЧ-1.

Мышей иммунизировали путем введения четырех доз отдельных вариантов MLB, включая дикий тип (MuоWT). После иммунизации сыворотки собирали и тестировали на их реактивность с мультимеризующимся gp120 консенсусной клады В ВИЧ-1, нанесенным на планшетах ELISA. Титры антител изотипа IgG измеряли методом ELISA. Выполняли статическое сравнение с помощью критерия Крускала-Уоллиса ANOVA с ретроспективным анализом с использованием критерия Данна (* P<0,05). Результаты показаны на Фиг. 10.

Связывание сывороток мышей, иммунизированных вариантами MLB, с мультимерным gp120 ВИЧ-1 специфически ингибируется антителами PGT126.

Сыворотки мышей, иммунизированных MLB036 и MLB041, тестировали на реактивность с рекомбинантным мультимерным консенсусным белком клады В ВИЧ-1, нанесенным на планшете ELISA, в конкуренции с PGT126 в качестве специфического ингибитора MLB, или антитела 10E8 (нерелевантное контрольное моноклональное антитело, mAb), последовательно разбавляемые для достижения указанных конечных концентраций в блокирующем буфере, наносили с отдельными сыворотками мышей, иммунизированных MLB036 или MLB041, разбавленными в соотношении 1:75 после 3-й или 1:200 после 4-й иммунизации. После промывания планшеты инкубировали с кроличьим моноклональным антителом к мышиному IgG, конъюгированному с ПОХ, проявляли субстратом и измеряли оптическую плотность при 492 нм. В контрольной реакции применяли 10E8 в указанных концентрациях. В отдельном эксперименте PGT126 в указанной концентрации наносили с разбавленными в соотношении 1:200 отдельными сыворотками иммунизированных MuоWT или наивных мышей в качестве контроля (MuоWT). Средние значения указаны горизонтальными линиями. Результаты представлены на Фиг. 11.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, имеющий длину до 180 аминокислот и содержащий последовательность, выбираемую из числа последовательностей, идентичных следующей последовательности или отличающихся от нее не более чем 5 аминокислотами:

KSELAVEILEKGQVRFWMQAX₂₁X₂₂X₂₃X₂₄GNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHIDX₅₀X₅₁X₅₂GIIEMFMEKLDQDEDEGTYTFQLQX₇₆X₇₇X₇₈X₇₉X₈₀NHSTVVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 2),

где

10 X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄ выбраны из KAQQ (SEQ ID NO. 33), LSVF (SEQ ID NO. 34), ATPS (SEQ ID NO. 35), EIMW (SEQ ID NO. 36), DGSS (SEQ ID NO. 37), LLPL (SEQ ID NO. 38), WMWW (SEQ ID NO. 39), MNLY (SEQ ID NO. 40), MWRN (SEQ ID NO. 41), IMME (SEQ ID NO. 42), KHQL (SEQ ID NO. 43), HWQF (SEQ ID NO. 44), YAGN (SEQ ID NO. 45) и HGQW (SEQ ID NO. 46);

15 X₅₀X₅₁X₅₂ выбраны из RNT, IMF, GHE, PSW, RAN, YFW, ITL, QAM, DMR, WLW, QGE, VQY и VSL;

X₇₆X₇₇X₇₈X₇₉X₈₀ выбраны из SHHLG (SEQ ID NO. 47), FMLMM (SEQ ID NO. 48), VILIL (SEQ ID NO. 49), IVTPL (SEQ ID NO. 50), DFIIW (SEQ ID NO. 51), MWSE(делеция) (SEQ ID NO. 52), LYYAW (SEQ ID NO. 53), MMIEY (SEQ ID NO. 54), WMTQT (SEQ ID NO. 55), PQLWL (SEQ ID NO. 56), EPIFL (SEQ ID NO. 57) и QTATY (SEQ ID NO. 58);

20 указанный полипептид необязательно дополнительно имеет аффинную метку, прикрепленную к N-концу или C-концу последовательности.

2. Полипептид по п. 1, который имеет длину до 180 аминокислот и содержит последовательность, выбираемую из числа последовательностей, идентичных следующим последовательностям или отличающихся от них не более чем 5 аминокислотами:

KSELAVEILEKGQVRFWMQAKAQQGNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHIDIMFGIIEMFMEKLDQDEGTYTFQLQSHHLGNHSTVVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 3)

KSELAVEILEKGQVRFWMQALSVMGNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHIDRNTGIIEMFMEKLDQDEGTYTFQLQFMLMMNHSTVVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 4)

30 KSELAVEILEKGQVRFWMQAATPSGNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHIDGHEGIIEMFMEKLDQDEGTYTFQLQVILILNHSTVVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 5)

KSELAVEILEKGQVRFWMQAEIMWGNKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHIDPSWGIIEMFMEKLDQDEGTYTFQLQIVTPLNHSTVVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 6)

- KSELAVEILEKGQVRFWMQADGSSGNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHIDRANGIEMFMEKLQD
EDEGTYTFQLQDFIIWNHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 7)
- KSELAVEILEKGQVRFWMQALLPLGNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHIDYFWGIIEMFMEKLQD
EDEGTYTFQLQMWSENHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 8)
- 5 KSELAVEILEKGQVRFWMQAWMWWGNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHIDITLGIEMFMEKLQ
DEDEGTYTFQLQLYYAWNHSSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 9)
- KSELAVEILEKGQVRFWMQAMNLYGNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHIDQAMGIIEMFMEKLQ
DEDEGTYTFQLQMMIEYNHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 10)
- KSELAVEILEKGQVRFWMQAMWRNGNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHIDRNTGIIEMFMEKLQ
10 DEDEGTYTFQLQWMTQTNHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 11)
- KSELAVEILEKGQVRFWMQAIMMEGNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHIDDMRGIEMFMEKLQ
DEDEGTYTFQLQIVTPLNHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 12)
- KSELAVEILEKGQVRFWMQAKHQLGNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHIDWLWGIEMFMEKLQ
DEDEGTYTFQLQIVTPLNHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 13)
- 15 KSELAVEILEKGQVRFWMQAHWQFGNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHIDQGEIEMFMEKLQ
DEDEGTYTFQLQPQLWLNHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 14)
- KSELAVEILEKGQVRFWMQAYAGNGNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHIDVQYGIEMFMEKLQ
DEDEGTYTFQLQEPIFLNHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 15) и
- KSELAVEILEKGQVRFWMQAHGQWGNNAKVNYIFNEKEIFEGPKYKMHIDVSLGIEMFMEKLQ
20 DEDEGTYTFQLQQTATYNHSTVVLVGDVFKKLQKEAEFQRQEWIRKQG (SEQ ID NO. 16),
указанный полипептид необязательно дополнительно имеет аффинную метку, прикрепленную к
N-концу или C-концу последовательности.

3. Полипептид по п. 1, имеющий следующие переменные в последовательности SEQ ID NO. 2:
- 25 $X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$ выбраны из KAQQ (SEQ ID NO. 33), LSVF (SEQ ID NO. 34), ATPS (SEQ ID NO. 35),
EIMW (SEQ ID NO. 36), DGSS (SEQ ID NO. 37), LLPL (SEQ ID NO. 38), WMWW (SEQ ID NO. 39)
и MNLY (SEQ ID NO. 40);
- $X_{50}X_{51}X_{52}$ выбраны из RNT, IMF, GHE, PSW, RAN, YFW, ITL и QAM;
- $X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}X_{80}$ выбраны из SHHLG (SEQ ID NO. 47), FMLMM (SEQ ID NO.48), VILIL (SEQ ID
30 NO.49), IVTPL (SEQ ID NO. 50), DFIIW (SEQ ID NO. 51), MWSE(делеция) (SEQ ID NO. 52),
LYYAW (SEQ ID NO. 53) и MMIEY (SEQ ID NO. 54).

4. Полипептид по п. 1, имеющий следующие переменные в последовательности SEQ ID NO. 2:

X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄ выбраны из MWRN (SEQ ID NO. 41), IMME (SEQ ID NO. 42) и KHQL (SEQ ID NO. 43);

X₅₀X₅₁X₅₂ выбраны из RNT, DMR и WLW;

X₇₆X₇₇X₇₈X₇₉X₈₀ выбраны из IVTPL (SEQ ID NO. 50) и WMTQT (SEQ ID NO. 55).

5

5. Полипептид по п. 1, имеющий следующие переменные в последовательности SEQ ID NO. 2:

X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄ выбраны из HWQF (SEQ ID NO. 44), YAGN (SEQ ID NO. 45) и HGQW (SEQ ID NO. 46);

X₅₀X₅₁X₅₂ выбраны из QGE, VQY и VSL;

10 X₇₆X₇₇X₇₈X₇₉X₈₀ выбраны из PQLWL (SEQ ID NO. 56), EPIFL (SEQ ID NO. 57) и QTATY (SEQ ID NO. 58).

6. Полипептид по любому из пп. 1–5, который имеет длину до 160, более предпочтительно до 140, еще более предпочтительно до 120 аминокислот.

15

7. Конъюгат полипептида по любому из пп. 1–6 с сывороточным альбумином или с белком теплового шока hsp70.

8. Полипептид по любому из пп. 1–6 или конъюгат по п. 7 для применения для индукции антител, нейтрализующих вирус ВИЧ-1, у нуждающегося в этом субъекта.

20

9. Полипептид по п. 3, для применения для индукции нейтрализующих вирус ВИЧ-1 антител, нацеленных на эпитоп, являющийся мишенью для нейтрализующего антитела широкого спектра действия 10E8, у нуждающегося в этом субъекта.

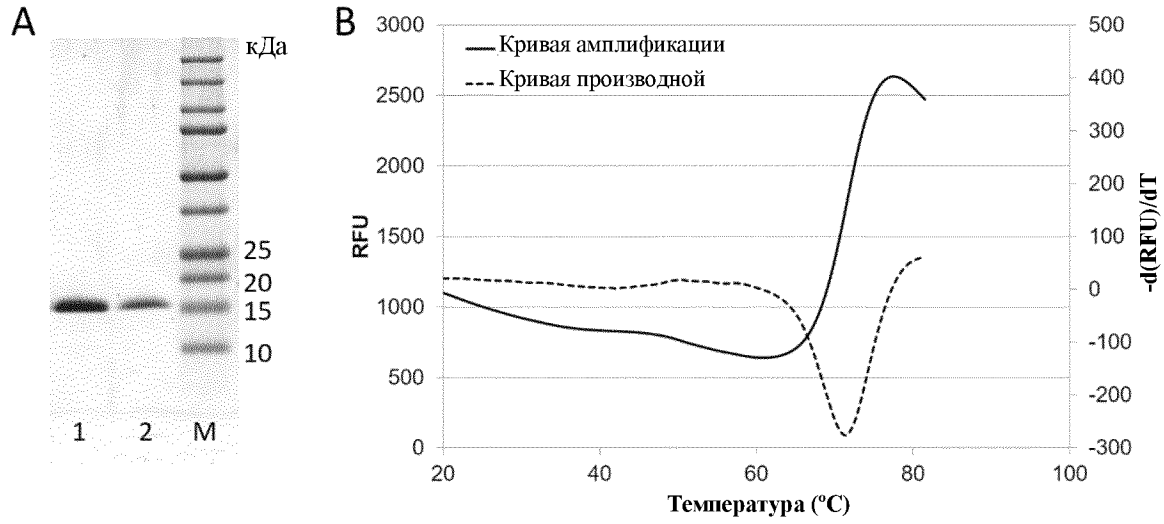
25

10. Полипептид по п. 4, для применения для индукции нейтрализующих вирус ВИЧ-1 антител, нацеленных на эпитоп, являющийся мишенью для нейтрализующего антитела широкого спектра действия PGT126, у нуждающегося в этом субъекта.

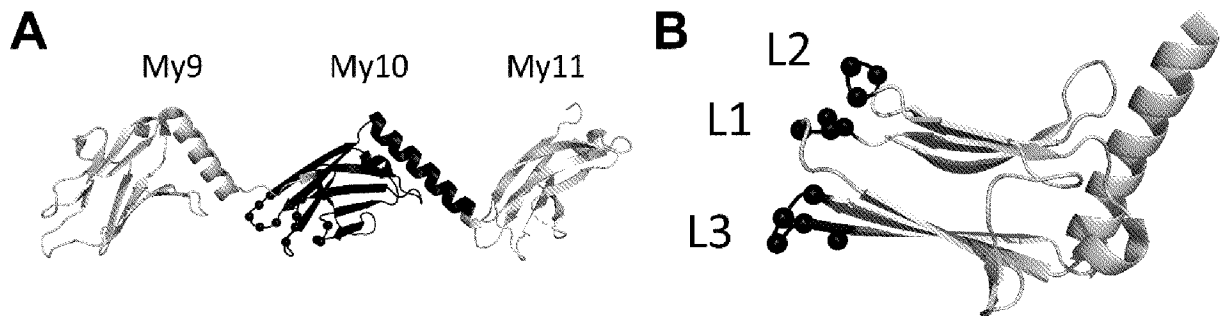
30 11. Полипептид по п. 5, для применения для индукции нейтрализующих вирус ВИЧ-1 антител, нацеленных на эпитоп, являющийся мишенью для нейтрализующего антитела широкого спектра действия PGT121, у нуждающегося в этом субъекта.

12. Полипептид по любому из пп. 1–6 или конъюгат по п. 11 для применения в профилактике заболеваний или расстройств, вызванных вирусом ВИЧ-1, предпочтительно для применения в профилактике заболевания ВИЧ.
- 5 13. Вакцина для профилактики вирусной инфекции ВИЧ-1, содержащая полипептид по любому из пп. 1–6 и/или конъюгат по п. 11 в качестве активного ингредиента или в качестве вспомогательного элемента.
- 10 14. Вакцина для применения в профилактике вирусной инфекции ВИЧ-1, содержащая полипептид по любому из пп. 1–6 и/или конъюгат по п. 11 в качестве активного ингредиента или в качестве вспомогательного элемента.
- 15 15. Комплементарная последовательность ДНК, кодирующая аминокислотную последовательность полипептида по любому из пп. 1–6.
16. Клетка-хозяин, отличающаяся тем, что она содержит по меньшей мере одну последовательность ДНК по п. 15.

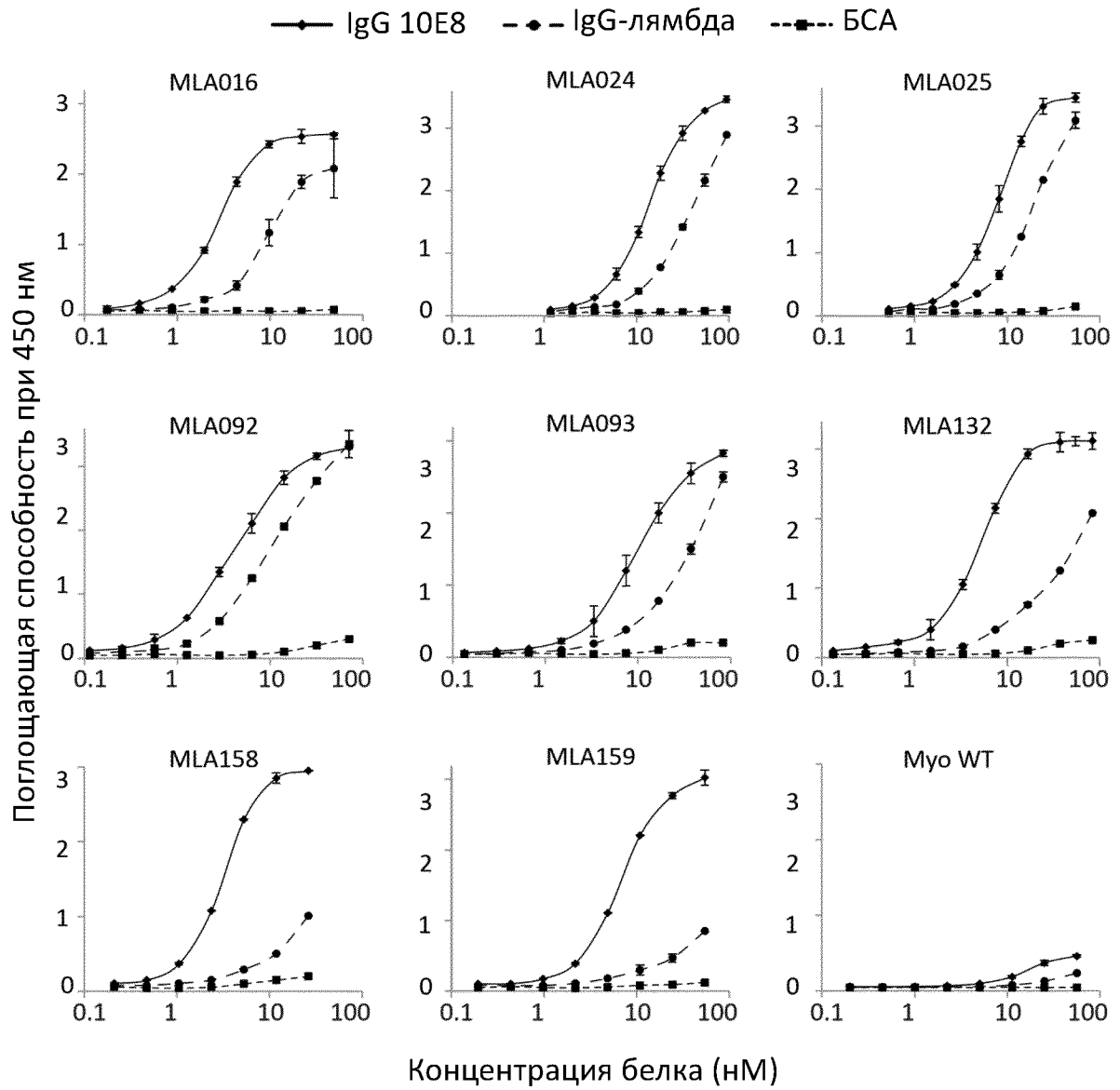
Фиг. 1



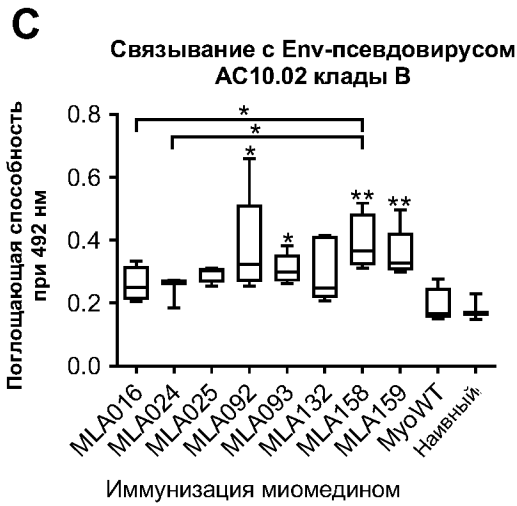
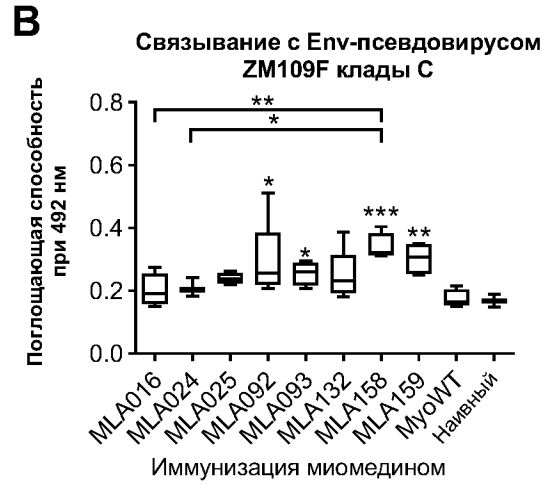
Фиг. 2



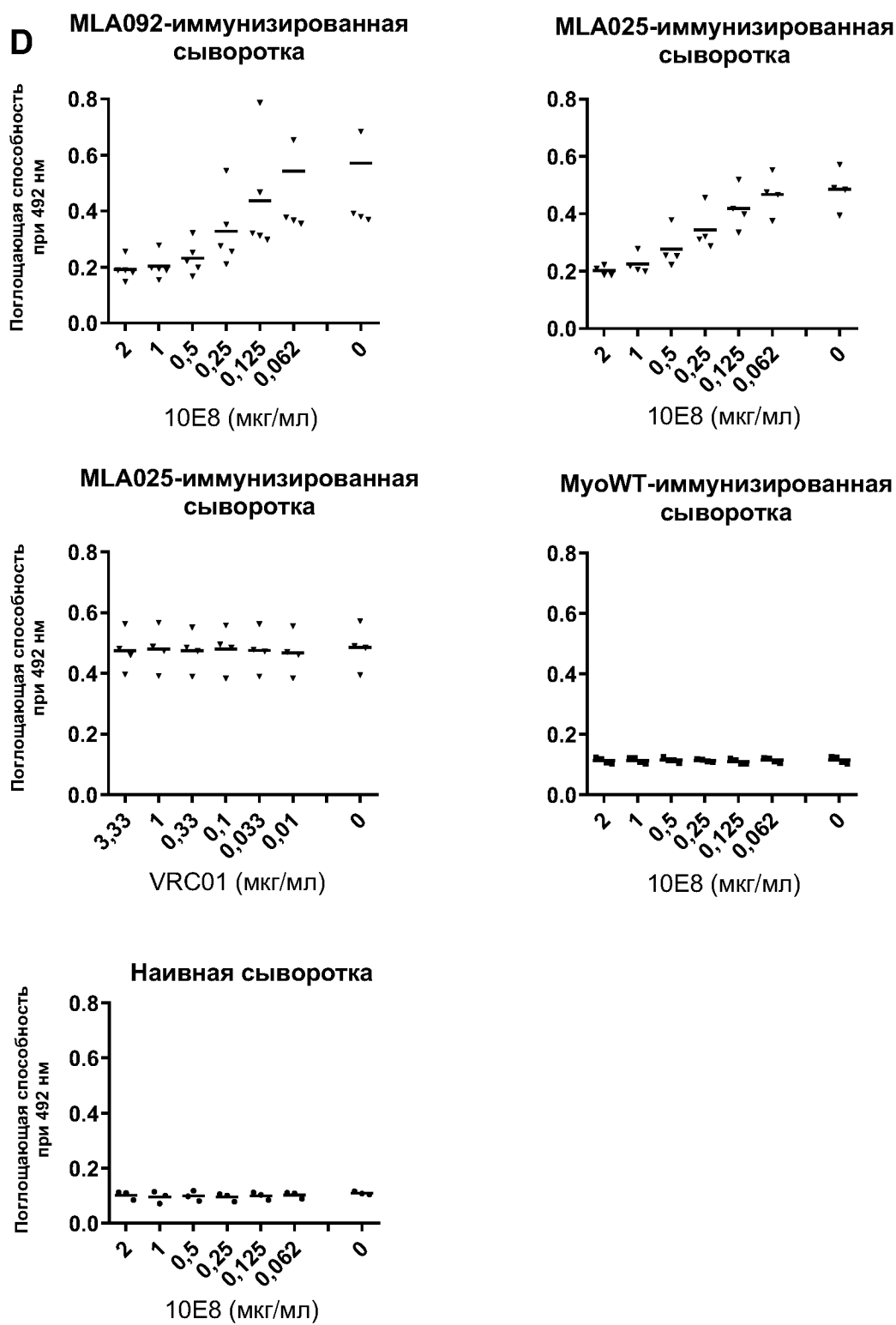
Фиг. 3



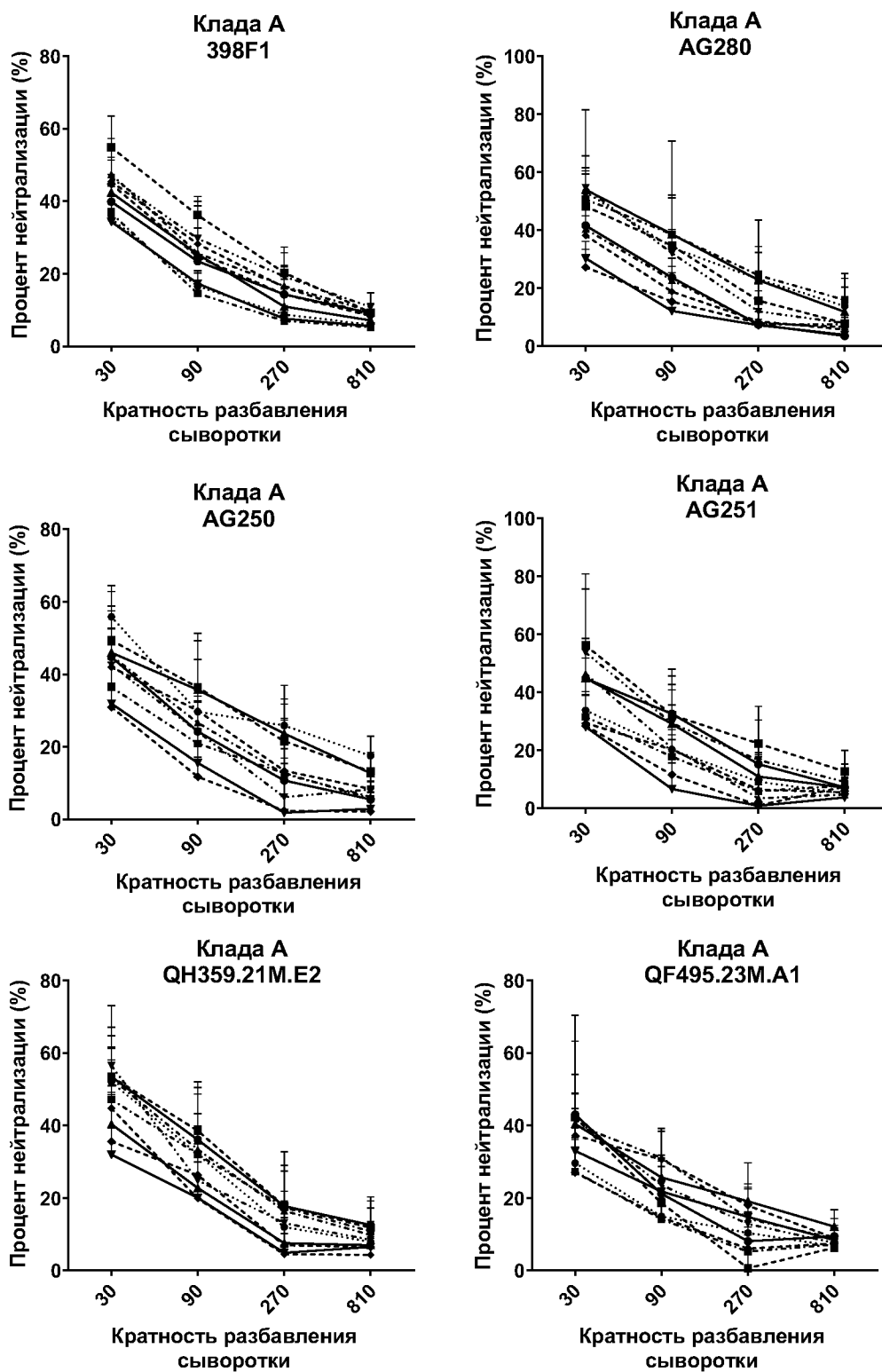
Фиг. 4



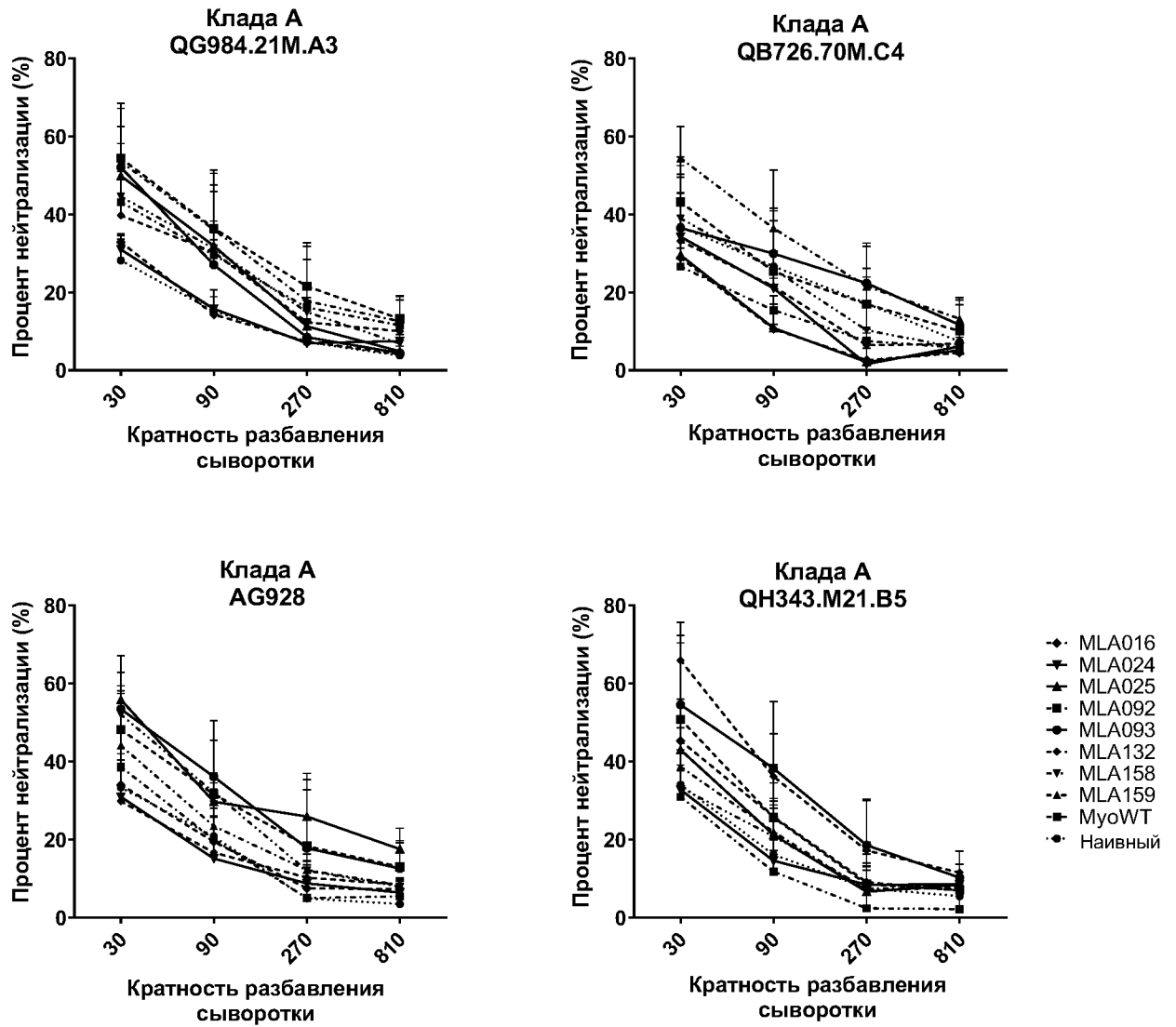
Фиг. 4 (продолжение)



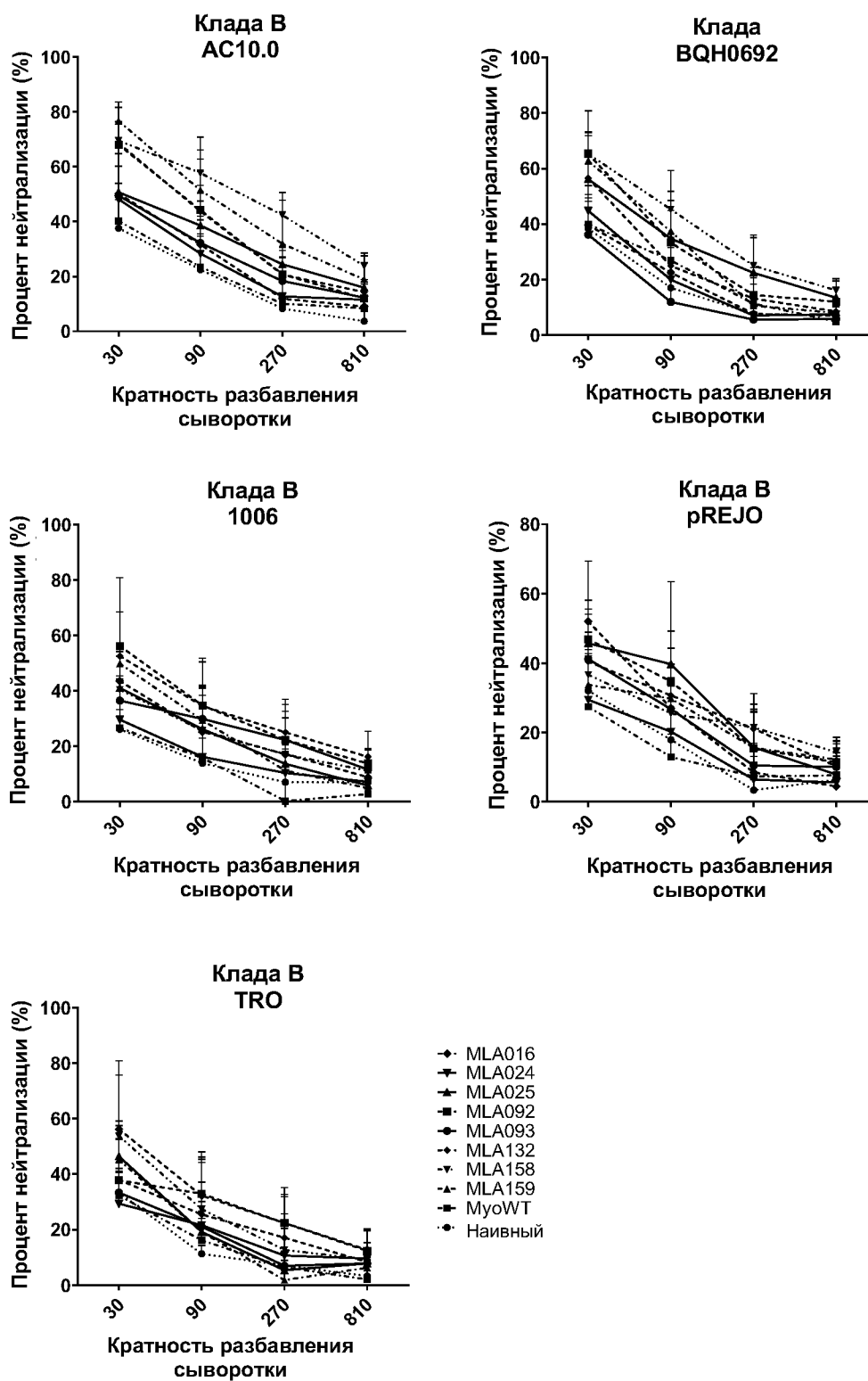
Фиг. 5



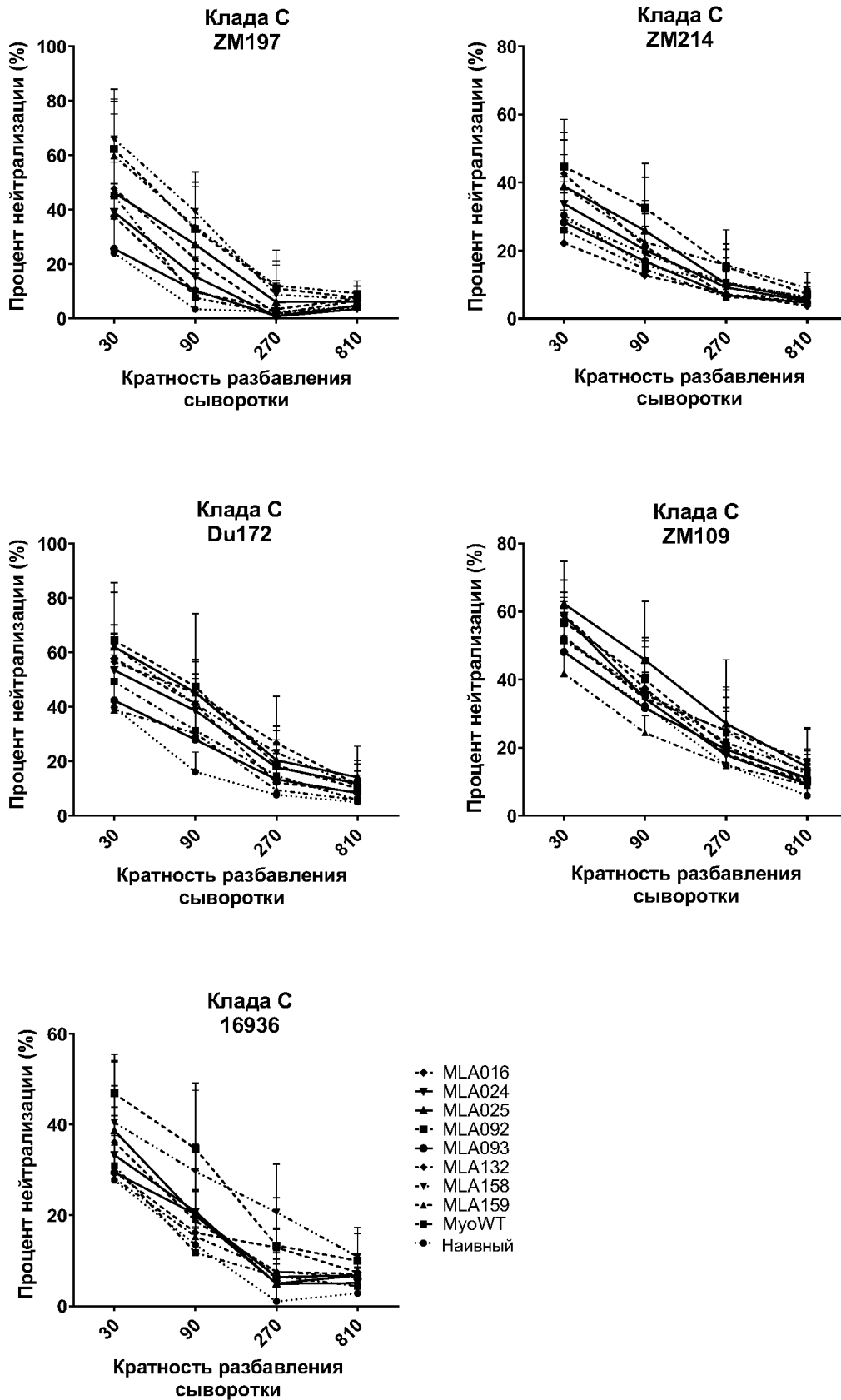
Фиг. 5 (продолжение)



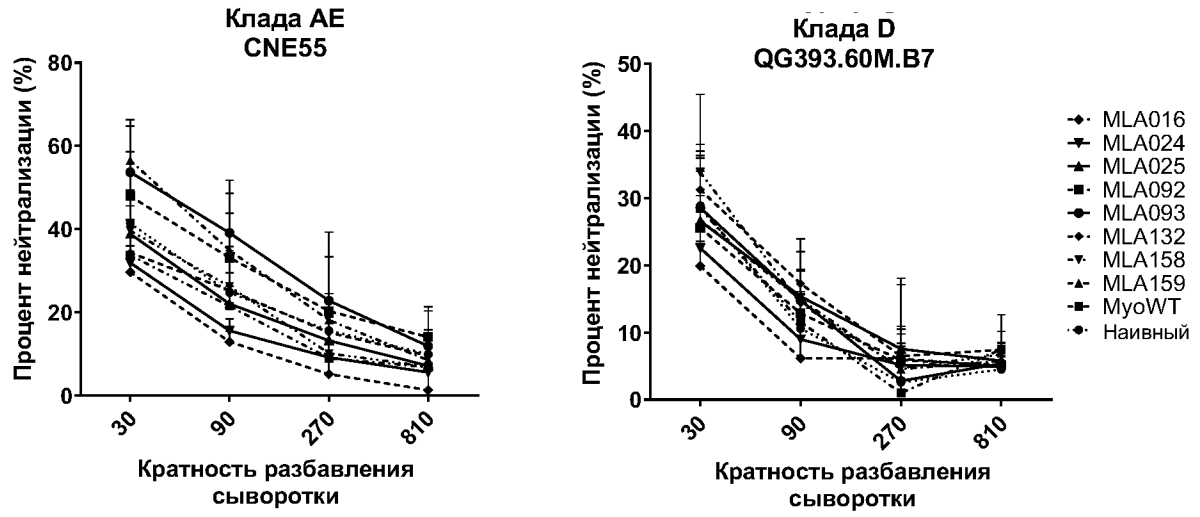
Фиг. 5 (продолжение)



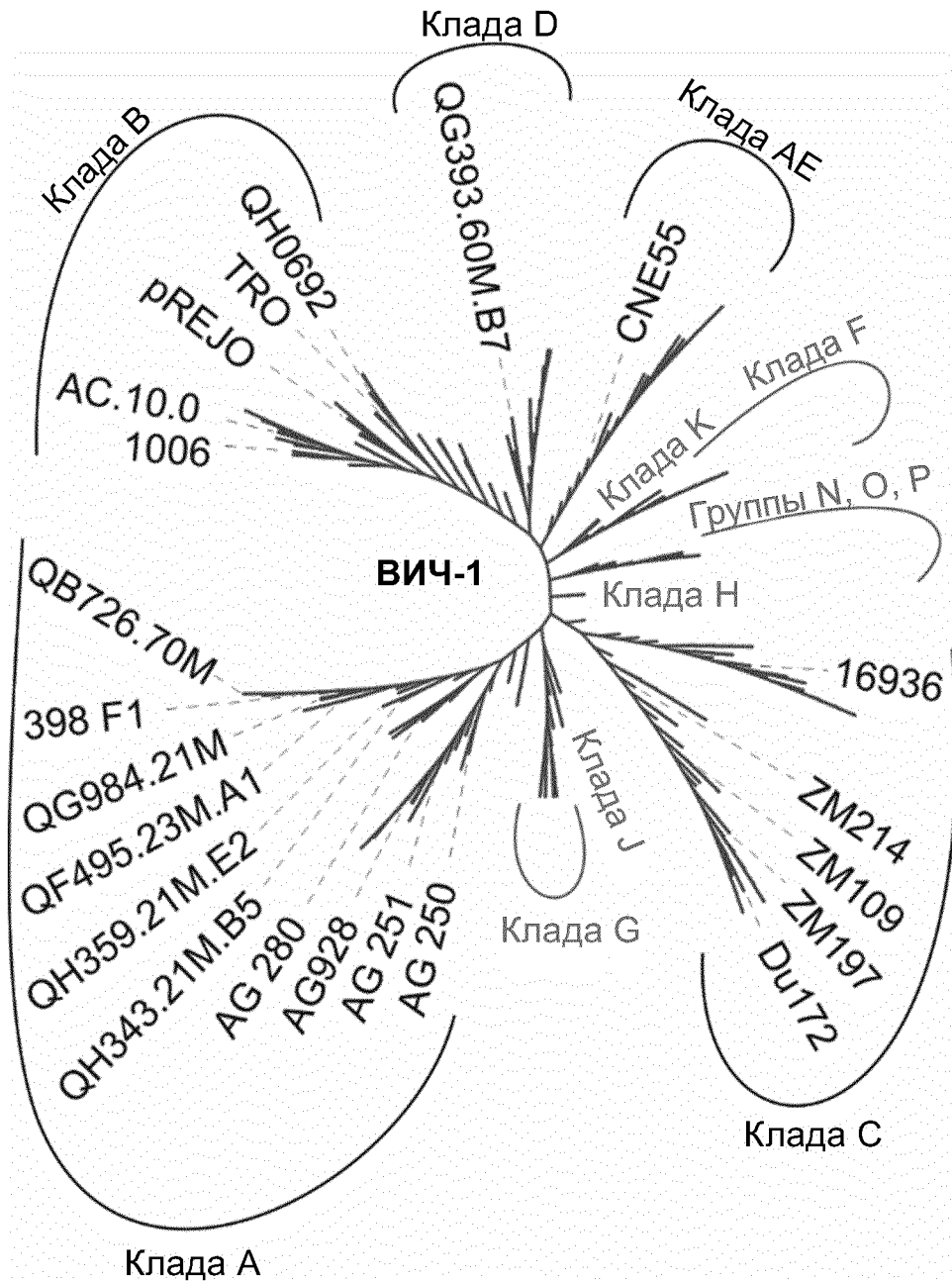
Фиг. 5 (продолжение)



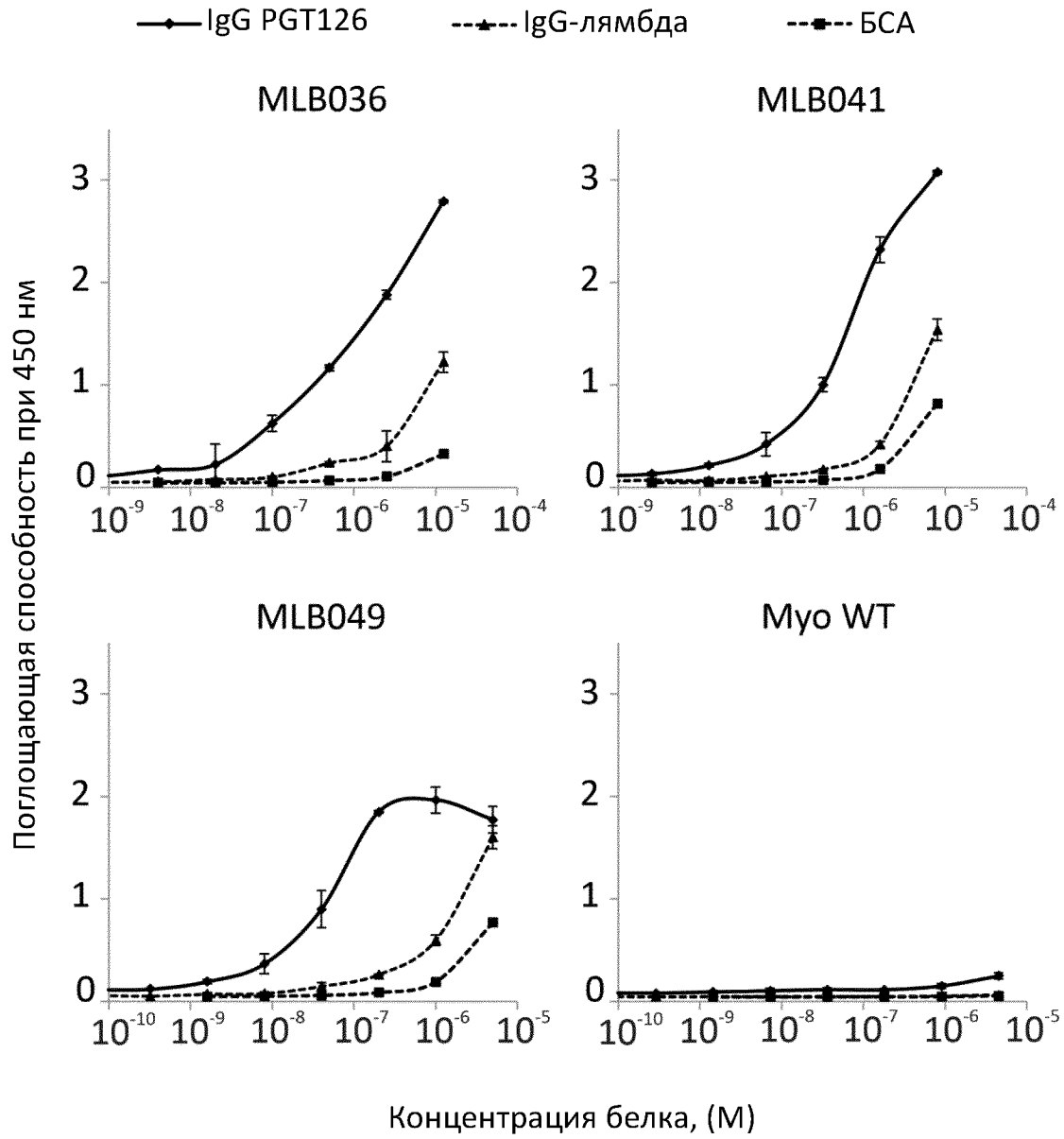
Фиг. 5 (продолжение)



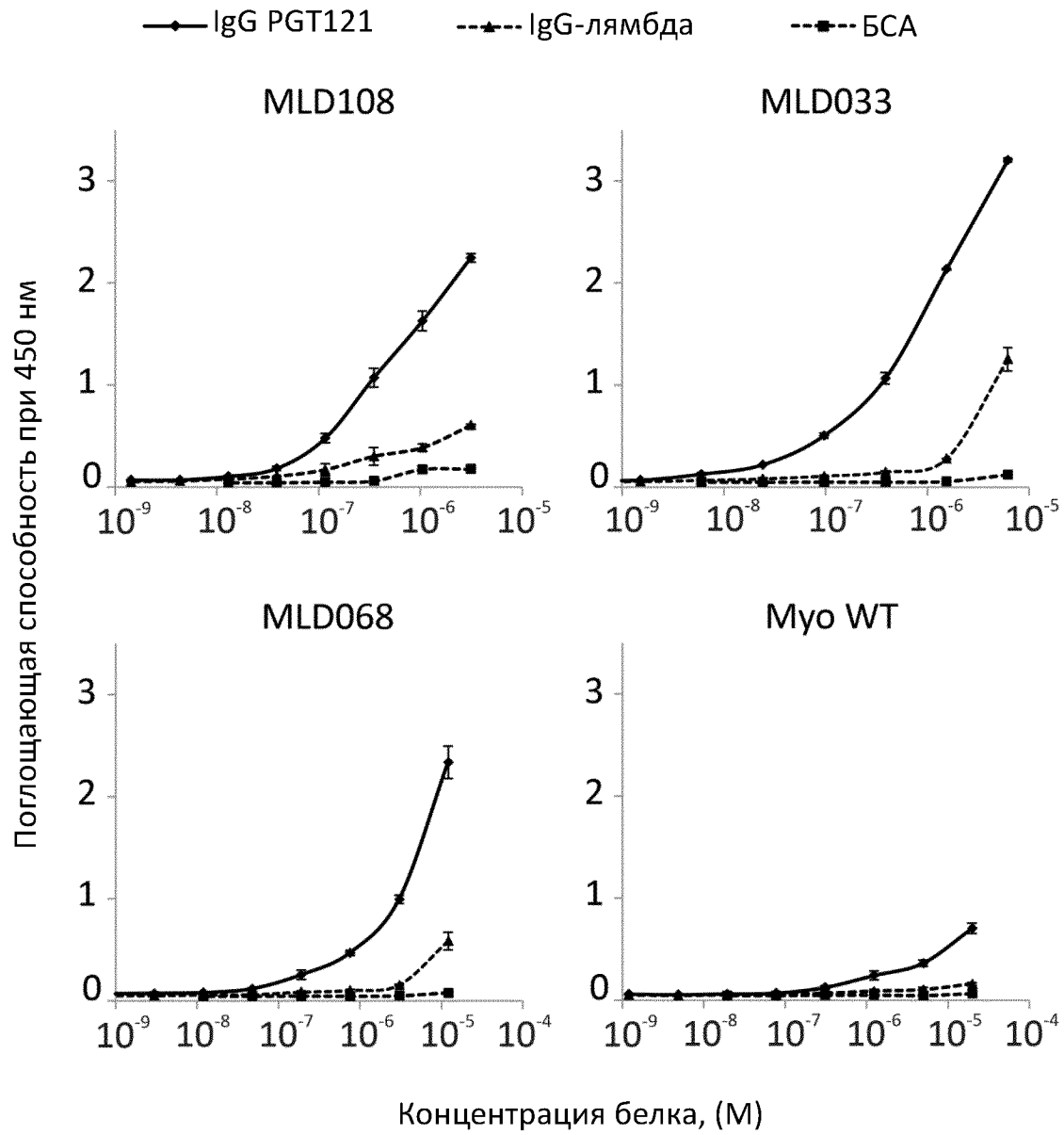
Фиг. 6



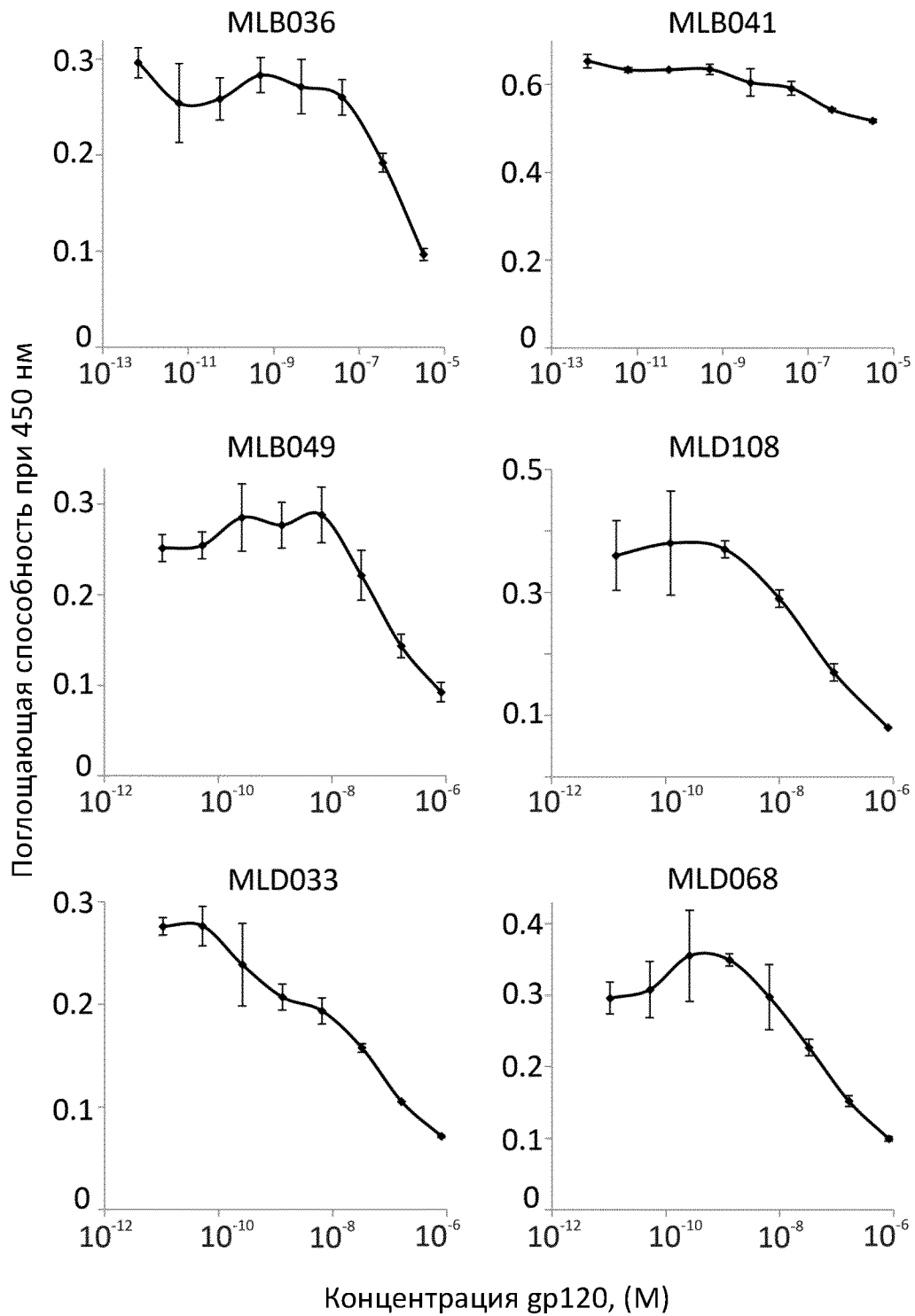
Фиг. 7



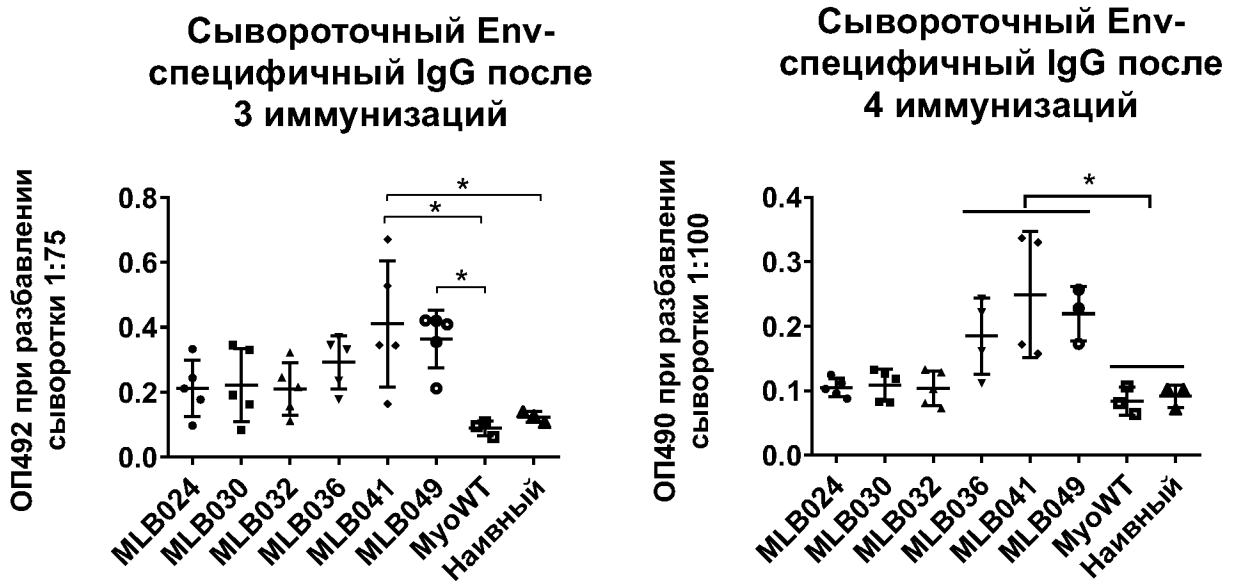
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11

