

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038250**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.07.29

(21) Номер заявки
201791562

(22) Дата подачи заявки
2016.01.22

(51) Int. Cl. **C07K 16/08** (2006.01)
A61K 39/245 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК GL ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА С МУТАЦИЕЙ В САЙТЕ РАСПОЗНАВАНИЯ ПРОТЕАЗОЙ, КОТОРАЯ УМЕНЬШАЕТ ПРОТЕАЗНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ

(31) **15152221.6**

(32) **2015.01.22**

(33) **EP**

(43) **2018.04.30**

(86) **PCT/IB2016/050335**

(87) **WO 2016/116904 2016.07.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ГЛАКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛС СА (ВЕ)**

(72) Изобретатель:
**Карфи Андреа, Циферри Клаудио,
Син И (US)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В. (RU)**

(56) WEN YINGXIA ET AL.: "Human cytomegalovirus gH/gL/UL128/UL130/UL131A complex elicits potentially neutralizing antibodies in mice", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 32, no. 30, 14 May 2014 (2014-05-14), pages 3796-3804, XP029006326, ISSN: 0264-410X, DOI:10.1016/J.VACCINE.2014.05.004, the whole document

RYCKMAN BRENT J ET AL.: "Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells", JOURNAL OF VIROLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 82, no. 1, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 60-70, XP002519851, ISSN: 1098-5514, DOI: 10.1128/JVI.01910-07 [retrieved on 2007-10-17], cited in the application, the whole document

WO-A1-2014005959

CLAUDIO CIFERRI ET AL.: "Structural and biochemical studies of HCMV gH/gL/gO and Pentamer reveal mutually exclusive cell entry complexes", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 112, no. 6, 26 January 2015 (2015-01-26), pages 1767-1772, XP055201992, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1424818112, the whole document

(57) Согласно данному изобретению предложен рекомбинантный белок gL цитомегаловируса или его фрагмент, которые содержат сайт распознавания протеазой в остатках 91-102, пронумерованных согласно SEQ ID NO: 1, и мутацию в указанном сайте распознавания протеазой, которая уменьшает протеазное расщепление в указанном сайте распознавания протеазой по сравнению с белком gL дикого типа. Также предложен цитомегаловирусный комплекс, обладающий уменьшенным протеазным расщеплением и содержащий указанный рекомбинантный белок gL или его фрагмент. Рекомбинантный белок gL и содержащий его цитомегаловирусный комплекс по изобретению могут входить в состав иммуногенной композиции для индуцирования иммунного ответа против цитомегаловируса.

038250 B1

038250 B1

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан электронно в формате ASCII и тем самым включен в данное описание полностью посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 14 января 2016 г. с названием VN056504WO_SL.txt, имеет размер 26466 байтов.

Область изобретения

Данное изобретение относится к области антигенов цитомегаловируса (CMV), которые могут быть использованы для вакцин.

Предшествующий уровень техники

Цитомегаловирус представляет собой род вирусов, который принадлежит к семейству вирусов, известному как Herpesviridae или вирусы герпеса. Вид, который инфицирует людей, обычно известен как человеческий цитомегаловирус (HCMV) или человеческий вирус герпеса-5 (HHV-5). В пределах Herpesviridae HCMV принадлежит к подсемейству Betaherpesvirinae, которое также включает цитомегаловирусы из других млекопитающих.

Несмотря на то, что они могут быть обнаружены по всему организму, инфекции HCMV часто ассоциированы со слюнными железами. HCMV инфицирует от 50 до 80% взрослых в Соединенных Штатах (40% по всему миру), на что указывает присутствие антител у значительной части общей популяции населения. Инфекция HCMV типично не заметна у здоровых людей, но может угрожать жизни людей с ослабленным иммунитетом, таких как ВИЧ-инфицированные субъекты, реципиенты пересаженных органов или новорожденные младенцы. HCMV является вирусом, который чаще всего передается развивающемуся плоду. После инфицирования HCMV способен оставаться латентным в организме в течение всей продолжительности жизни со случайными время от времени реактивациями из состояния латентности. Принимая во внимание тяжесть и важность данного заболевания, получение эффективной вакцины считается важнейшим приоритетом для здравоохранения (Sung H., et al., (2010) Expert review of vaccines 9, 1303-1314; Schleiss, Expert Opin Ther Pat. Apr 2010; 20(4): 597-602).

Геномы более чем 20 разных штаммов HCMV были секвенированы, включая геномы как лабораторных штаммов, так и клинических изолятов. Например, были секвенированы следующие штаммы HCMV: Towne (GL239909366), AD169 (GI:219879600), Toledo (GL290564358) и Merlin (GI:155573956). Штаммы HCMV AD169, Towne и Merlin могут быть получены из Американской коллекции типовых клеточных культур (ATCC VR538, ATCC VR977 и ATCC VR1590 соответственно).

Цитомегаловирус содержит неизвестное число мембранных белковых комплексов. Из приблизительно 30 известных гликопротеинов в вирусной оболочке gH и gL оказались особенно интересными из-за их присутствия в нескольких разных комплексах: димерном gH/gL, тримерном gH/gL/gO (также известном как комплекс gCIII) и пентамерном gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 (pUL131 также называют "pUL131A", "pUL131a", или "UL131A"; субъединицы pUL128, pUL130 и pUL131 иногда также называют UL128, UL130, UL131). Считается, что CMV использует пентамерные комплексы для проникновения в эпителиальные и эндотелиальные клетки посредством эндоцитоза и независимого от низких значений pH слияния, но полагают, что он проникает в фибробласты путем непосредственного слияния на плазматической мембране в процессе, включающем gH/gL или возможно gH/gL/gO. Комплекс(ы) gH/gL и/или gH/gL/gO является(ются) достаточным(и) для инфицирования фибробластов, тогда как пентамерный комплекс требуется для инфицирования эндотелиальных и эпителиальных клеток.

Считается, что пентамерный комплекс служит в качестве главной мишени для вакцинации против CMV. Вирусные гены UL128, UL130 и UL131 необходимы для проникновения в эндотелий (Hahn, Journal of Virology 2004; 78: 10023-33). Адаптированные к фибробластам неэндотелиальные тропические штаммы содержат мутации в по меньшей мере одном из этих трех генов. Штамм Towne, например, содержит вставку двух пар оснований, вызывающую сдвиг рамки считывания в гене UL130, тогда как AD169 содержит вставку одной пары оснований в гене UL131. И Towne, и AD169 могли бы адаптироваться для роста в эндотелиальных клетках, и в обоих случаях мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания в генах UL130 и UL131, подвергались репарации.

В US 7704510 раскрыто, что pUL131A требуется для тропизма в эпителиальные клетки. В US7704510 также раскрыто, что pUL128 и pUL130 образуют комплекс с gH/gL, который включается в вирионы. Данный комплекс требуется для инфицирования эндотелиальных и эпителиальных клеток, но не фибробластов. Было обнаружено то, что антитела против CD46 ингибируют инфицирование эпителиальных клеток HCMV.

Вакцины против CMV, протестированные в клинических испытаниях, включают вакцину на основе Towne, на основе химер Towne-Toledo, на основе репликона альфа вируса с gB в качестве антигена, вакцину на основе gB/MF59, вакцину на основе gB, произведенную GlaxoSmithKline, и ДНК-вакцину с использованием gB и pp65. pp65 представляет собой вирусный белок, который является мощным индуктором ответов CD8+, направленных против CMV. Все данные вакцины являются слабыми индукторами антител, которые блокируют проникновение вируса в эндотелиальные/эпителиальные клетки (Adler S. P. (2013), British Medical Bulletin, 107, 57-68. doi:10.1093/bmb/ldt023).

Доклинические исследования на животных в вакцинах против CMV включают инактивированный AD169, который подвергся репарации в гене UL131, ДНК-вакцину с использованием гена UL130 дико-

го типа и пептидные вакцины с использованием пептидов из pUL130 и 131 (Sauer A, et al., Vaccine 2011;29: 2705-I, doi:10.1016).

Антиген gB CMV считается слабым индуктором антител, которые блокируют проникновение в эндотелиальные/эпителиальные клетки. В клиническом испытании фазы II вакцина на основе gB/MF59 была только на 50% эффективной в предупреждении первичной инфекции среди молодых женщин, воспитывающих ребенка дома (Pass, RF, et al., N Engl J Med 2009; 360:1191-9).

Следовательно, имеется необходимость в разработке вакцин против CMV, содержащих другие антигены-мишени, такие как gH/gL, gH/gL/gO или пентамерный комплекс gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131.

Краткое изложение сущности изобретения

Как раскрыто и проиллюстрировано в данном описании, авторы изобретения обнаружили, что при рекомбинантной экспрессии антигена gL цитомегаловируса и очистке из млекопитающего-хозяина (такого как клетка CHO (яичники китайского хомяка) или клетка HEK (эмбриональная почка человека)) значительная часть gL расщепляется. Для улучшения рекомбинантной экспрессии и очистки интактного белка gL вводили мутации для уменьшения протеазного расщепления gL. Данные мутанты демонстрируют повышенную устойчивость к протеазному расщеплению во время рекомбинантного продуцирования.

Согласно настоящему изобретению предложен рекомбинантный белок gL цитомегаловируса или его фрагмент, который сохраняет способность к образованию комплекса с другим белком цитомегаловируса, причем указанный белок gL или фрагмент содержит сайт распознавания протеазой в остатках 91-102, пронумерованных согласно SEQ ID NO: 1, и мутацию в указанном сайте распознавания протеазой, где указанная мутация уменьшает протеазное расщепление в указанном сайте распознавания протеазой по сравнению с белком gL дикого типа и представляет собой:

- а) вставку F, Q, FQ или QF между остатками N97 и S98;
- б) делецию остатка, выбранного из группы, состоящей из A95, A96, N97, и их комбинации;
- в) замену A96 на I, L, V или S;
- г) замену A95 на R, L, E или N;
- д) замену N97 на полярный остаток или неполярный остаток;
- е) замену S98 на аминокислотный остаток с маленькой боковой цепью;
- ж) замену V99 на I;
- з) замену L100 аминокислотным остатком F или V;
- и) замену L101 аминокислотным остатком V или I или комбинацию вышеуказанного.

В предпочтительном воплощении указанная в (д) замена N97 представляет собой замену на полярный остаток, содержащий маленькую боковую цепь, либо замену на полярный остаток, содержащий большую боковую цепь.

В еще одном предпочтительном воплощении указанная в (е) замена S98 представляет собой замену на G, T, V или I.

Согласно одному аспекту изобретения предложен рекомбинантный белок gL цитомегаловируса или его фрагмент, который сохраняет способность к образованию комплекса с другим белком цитомегаловируса, причем указанный белок gL или фрагмент содержит сайт распознавания протеазой в остатках 91-102, пронумерованных согласно SEQ ID NO: 1, и мутацию в указанном сайте распознавания протеазой, где указанная мутация уменьшает протеазное расщепление в указанном сайте распознавания протеазой по сравнению с белком gL дикого типа и представляет собой тройную мутацию A96L/N97S/S98G.

Согласно еще одному аспекту изобретения предложен рекомбинантный белок gL цитомегаловируса или его фрагмент, который сохраняет способность к образованию комплекса с другим белком цитомегаловируса, причем указанный белок gL или фрагмент содержит сайт распознавания протеазой в остатках 91-102, пронумерованных согласно SEQ ID NO: 1, и мутацию в указанном сайте распознавания протеазой, где указанная мутация уменьшает протеазное расщепление в указанном сайте распознавания протеазой по сравнению с белком gL дикого типа и представляет собой тройную мутацию A96I/N97D/S98G.

Также согласно изобретению предложен цитомегаловирусный комплекс, обладающий уменьшенным протеазным расщеплением и содержащий: рекомбинантный белок gL или его фрагмент по изобретению, как они определены выше, и белок gH или его фрагмент.

В предпочтительном воплощении указанный комплекс представляет собой пентамерный комплекс, дополнительно содержащий: белок pUL128 или его фрагмент, белок pUL130 или его фрагмент и белок pUL131 или его фрагмент.

Кроме того, согласно изобретению предложена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный белок gL цитомегаловируса или фрагмент по изобретению, как они определены выше.

Также согласно изобретению предложена клетка-хозяин, содержащая указанную нуклеиновую кислоту по изобретению.

В предпочтительном воплощении указанная клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.

В еще более предпочтительном воплощении указанная клетка-хозяин, как она определена выше,

дополнительно содержит одну или более чем одну нуклеотидную последовательность, кодирующую gH или его фрагмент, pUL128 или его фрагмент, pUL130 или его фрагмент и pUL131 или его фрагмент.

Согласно настоящему изобретению также предложена иммуногенная композиция, содержащая рекомбинантный белок gL цитомегаловируса или его фрагмент по изобретению или цитомегаловирусный комплекс по изобретению, как они определены выше.

Предпочтительной является иммуногенная композиция, дополнительно содержащая адъювант.

Также согласно настоящему изобретению предложено применение иммуногенной композиции, как она определена выше, для индуцирования иммунного ответа против цитомегаловируса.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1А показано частичное выравнивание последовательностей белков gL из разных вирусов герпеса около сайта распознавания протеазой (SEQ ID NO: 12-15, соответственно, в порядке появления). На фиг. 1Б показана вторичная структура комплекса gH/gL из HSV-2 (вирус простого герпеса-2) и VZV (вирус ветряной оспы). Стрелка показывает сайт расщепления.

На фиг. 2А показаны частичные последовательности мутантов gL (SEQ ID NO: 15-26, соответственно, в порядке появления). На фиг. 2Б показан результат вестерн-блоттинга с использованием антител против gL. На фиг. 2В показан результат вестерн-блоттинга с использованием антител против His.

На фиг. 3 показан анализ вестерн-блоттингом WT (дикий тип) и LSG мутантного пентамера с использованием либо невосстановленных (NR), либо восстановленных и прокипяченных (RB) образцов белка.

На фиг. 4 показан анализ вестерн-блоттингом WT и IDG мутантного пентамера с использованием либо невосстановленных (NR), либо восстановленных и прокипяченных (RB) образцов белка.

На фиг. 5А показан очищенный WT пентамер и мутантные IDG и LSG пентамеры. На фиг. 5Б показан титр нейтрализующих антител (NAB) сыворотки мышей, иммунизированных пентамерами WT, мутантным LSG или мутантными IDG пентамерами с адъювантом MF59.

Подробное описание изобретения

1. Обзор

Как раскрыто и проиллюстрировано в данном описании, авторы изобретения обнаружили, что при рекомбинантной экспрессии антигена gL цитомегаловируса и очистке из млекопитающего-хозяина (такого как клетка CHO или клетка HEK) значительная часть gL расщепляется (что также называют "разрезание gL") неизвестной протеазой. Фактически, было обнаружено, что разрезание gL происходило во время рекомбинантной экспрессии и очистки трех разных комплексов CMV: комплекса gH/gL, комплекса gH/gL/gO и пентамерного комплекса gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131. Разрезание gL вызывало неомогенность продукции антигена и потенциальную потерю нейтрализующих сайтов на антигенах на основе gL.

С использованием вестерн-блоттинга и N-концевого секвенирования авторы изобретения идентифицировали и картировали сайт расщепления на пептидной связи между остатками 97 и 98 gL из штамма Merlin (SEQ ID NO:1) (фиг. 1). Для решения проблемы разрезания авторы изобретения исследовали структурные характеристики белков gL из нескольких родственных вирусов герпеса, включая HCV1, HSV2 и VZV. Белки gL из HCV1, HSV2 и VZV, по-видимому, не имеют проблемы разрезания. На основе структурных исследований авторы изобретения обнаружили, что в сайт распознавания протеазой могут быть введены мутации, включающие аминокислотные остатки 91 и 102, для уменьшения протеазного расщепления рекомбинантно экспрессированного gL.

Например, как проиллюстрировано в данном описании, тройная мутация A96L/N97S/S98G (мутант "LSG") и тройная мутация A96I/N97D/S98G (мутант "IDG") по существу устраняла проблему разрезания gL. Два других мутанта: делеция остатка Asn97 (дельта Asp97) и A96S/N97S/S98T (мутант "SST") также демонстрировали кардинально пониженное разрезание gL при совместной экспрессии gH и gL.

На основе структурного анализа белков gL из других вирусов герпеса (фиг. 1) видно, что сайт распознавания протеазой принимает от N-конца к С-концу структуру возможной короткой α -спирали (⁹¹VTPE⁹⁴) (SEQ ID NO: 27), короткой петли (⁹⁵AA⁹⁶) и консервативного β -тяжа (⁹⁷NSVLLD¹⁰²) (SEQ ID NO: 7). Расщепление происходит на N-терминальном конце β -тяжа (фиг. 1). Бета-тяж представляет собой структурную единицу β -складчатых слоев в белках. Он представляет собой вытянутый отрезок полипептидной цепи, как правило от 3 до 10 аминокислот в длину, который образует водородные связи с другими β -тяжами в том же самом β -складчатом слое. Как показано на фиг. 1, данный β -тяж (β 4 на фиг. 1), совместно с тяжами β 5 и β 6 из gL, а также с 4-тяжами из gH, формирует β -складчатый слой. Следовательно, в предпочтительных воплощениях мутация должна поддерживать вторичную структуру С-концевой области сайта распознавания протеазой (т.е. конформация β -тяжа сохраняется таким образом, что по существу поддерживаются взаимодействия между β 4 и другими β -тяжами). Поддержание структуры β -тяжа может потенциально уменьшать любое отрицательное влияние на сборку комплексов CMV (таких как пентамерные комплексы) и также может потенциально сохранять важные иммуногенные эпитопы. Например, один или более чем один остаток из сайта распознавания протеазой может быть заменен соответствующим остатком из другого вируса герпеса (такого как HSV-1, HSV-2 или VZV). Как по-

казано на фиг. 1, последовательность и структурный анализ показывают, что замена остатка CMV соответствующим остатком HSV-1, HSV-2 или VZV не изменяет конформацию β -тяжа, тогда как расщепление протеазой может уменьшаться. Возможно также может поддерживаться структура короткой петли, непосредственно предшествующая β -тяжу (⁹⁵AA⁹⁶ на фиг. 1).

Соответственно, в одном аспекте согласно изобретению предложен белок gL рекомбинантного цитомегаловируса (CMV) или его фрагмент, образующий комплекс, где указанные белок gL или фрагмент содержат мутацию в сайте распознавания протеазой, где указанная мутация уменьшает расщепление протеазой в указанном сайте распознавания протеазой по сравнению с контролем. Сайт распознавания протеазой относится к остаткам 91-102 (нумерация основана на SEQ ID NO: 1). Предпочтительно данная мутация уменьшает расщепление протеазой по сравнению с контролем без изменения структуры β -тяжа в С-концевой области сайта распознавания протеазой.

Здесь также предложены комплексы CMV, содержащие описанные здесь белки gL или фрагменты. Такие комплексы могут представлять собой комплекс gH/gL, комплекс gH/gL/gO и пентамерный комплекс gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131.

Здесь также предложены клетки-хозяева для рекомбинантной экспрессии описанных здесь белков gL или фрагментов и комплексы CMV, содержащие описанные здесь белки gL или фрагменты. Как было отмечено, разрезание gL наблюдали в клетках-хозяевах млекопитающих во время процесса рекомбинантного продуцирования. Следовательно, раскрытые здесь мутации являются особенно подходящими для рекомбинантного продуцирования вакцин против CMV в млекопитающих-хозяевах (которые являются предпочтительными хозяевами для многих биологических агентов). Например, клетки HEK-293 и CHO в течение длительного времени используют для коммерческой биологической продукции. Следовательно, включение мутаций, которые уменьшают расщепление gL, может улучшать эффективность продукции и выход, а также уменьшать образование загрязняющего частично деградированного продукта.

2. Определения

Термин "фрагмент, образующий комплекс" белка (такого как gL) цитомегаловируса (CMV) относится к любой части или области данного белка, которая сохраняет способность к образованию комплекса с другим белком CMV. Такие комплексы включают, например, димерный комплекс gH/gL, тримерный комплекс gH/gL/gO или пентамерный комплекс gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131. Термин "фрагмент, образующий пентамер" белка CMV (такого как gL) относится к любой части или области белка, которая сохраняет способность образовывать пентамерный комплекс gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131.

Термин "пентамерный комплекс" или "пентамер", как он использован здесь, относится к комплексу CMV, который содержит пять разных субъединиц: gH, gL, pUL128, pUL130 и pUL131. Несмотря на то, что в данном описании изобретения он обычно называется пентамер gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 (или пентамерный комплекс, содержащий gH, gL, pUL128, pUL130 и pUL131), каждая из пяти субъединиц не обязательно должна быть полноразмерной; данный термин также охватывает пентамеры, образованные фрагментами gH, gL, pUL128, pUL130 и pUL131, образующими комплекс.

Термин "мутация" относится к вставке, делеции или замене аминокислотного остатка. Данный термин также включает модификации, которые вводят в полипептидную цепь аминокислоту, не встречающуюся в природе, или аминокислотный аналог.

Заряженные аминокислотные остатки включают D, E, K, R и H. Полярные незаряженные остатки включают S, T, C, Y, N и Q. Неполярные или гидрофобные остатки включают A, V, L, I, M, W, F и P.

Аминокислотные остатки, содержащие боковую цепь, включают W, F, M, Y, Q, R, E, H и K. Аминокислотные остатки, у которых отсутствует боковая цепь или содержащие маленькую боковую цепь, включают G, A, V, S, T, C, D и N.

Аминокислотный остаток содержит "объемную боковую цепь", когда боковая цепь содержит разветвленный или циклический заместитель. Примеры аминокислотных остатков с объемной боковой цепью включают триптофан, тирозин, фенилаланин, гомофенилаланин, лейцин, изолейцин, гистидин, 1-метилтриптофан, α -метилтирозин, α -метилфенилаланин, α -метиллейцин, α -метилизолейцин, α -метилгистидин, циклопентилаланин, циклогексилаланин, нафтилаланин и так далее.

Хотя настоящее изобретение применимо к белкам gL, происходящим из любого штамма CMV, для того чтобы облегчить его понимание, при ссылке на положения аминокислот в настоящем описании, нумерация приведена применительно к аминокислотной последовательности белка gL SEQ ID NO: 1, происходящей из штамма Merlin, если не утверждается иное. Настоящее изобретение однако не ограничивается штаммом Merlin. С использованием идей настоящего изобретения специалисты в данной области техники могут определить сопоставимые положения аминокислот в белке gL любого другого штамма CMV посредством выравнивания аминокислотных последовательностей с использованием легкодоступных и хорошо известных алгоритмов выравнивания (таких как BLAST с использованием установок по умолчанию; ClustalW2 с использованием установок по умолчанию; или алгоритм, раскрытый Copret, Nucleic Acids Research, 1998, 16(22): 10881-10890, с использованием установок по умолчанию). Соответственно, при ссылке на "белок gL CMV" его следует понимать как белок gL CMV из любого штамма (помимо штамма Merlin). Реальный номер для белков gL из других штаммов, возможно, должен быть скор-

ректирован в зависимости от реального выравнивания последовательностей.

Например, "сайт распознавания протеазой" определен как состоящий из аминокислотных остатков 91-102, в частности, состоящий из остатков 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101 и 102. Данные номера приведены применительно к аминокислотной последовательности белка gL SEQ ID NO: 1. Сайт распознавания протеазой из белков gL из других штаммов CMV или других мутантов, или вариантов gL, или фрагментов gL может быть установлен с использованием стандартных программ выравнивания последовательностей, которые выравнивают запрашиваемую последовательность с последовательностью SEQ ID NO: 1 и идентифицируют остатки, которые соответствуют остаткам 91-102 SEQ ID NO: 1.

Конкретные положения аминокислотных остатков также пронумерованы согласно SEQ ID NO: 1. Например, "S98" относится к положению 98 SEQ ID NO: 1 (которое представляет собой S), а также к соответствующим остаткам из других последовательностей gL (или вариантов, или фрагментов), которые соответствуют S98 SEQ ID NO: 1 при выравнивании последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1. Для простоты любой остаток из последовательности gL (или варианта, или фрагмента), который соответствует S98 SEQ ID NO: 1, называется S98, хотя реальное положение данного остатка может быть или может не быть 98, и реальный остаток может быть или может не быть S. Например, консервативная замена (например, T) может выравниваться с S98 SEQ ID NO: 1. Консервативная замена типично идентифицируется BLAST 2 как "положительная" или "+".

Аналогично, мутации также идентифицируют согласно нумерации SEQ ID NO:

1. Например, S98G означает, что любой остаток из последовательности gL (или вариант, или фрагмент), который соответствует S98 SEQ ID NO: 1, мутируется до G.

Аминокислотный остаток запрашиваемой последовательности "соответствует" обозначенному положению эталонной последовательности (например, S98 SEQ ID NO: 1), когда посредством выравнивания запрашиваемой аминокислотной последовательности с эталонной последовательностью положение данного остатка соответствует обозначенному положению. Такие выравнивания можно делать вручную или с использованием хорошо известных программ выравнивания последовательностей, таких как ClustalW2 или "BLAST 2 Sequences" с использованием параметров по умолчанию.

" " относится к последовательности, которая имеет длину по меньшей мере 10 аминокислотных остатков и является по меньшей мере на 50% идентичной SEQ ID NO: 5. Как показано на фиг. 1, для gL дикого типа из штамма Merlin, был идентифицирован фрагмент из 17 остатков, уникальный для gL CMV, по сравнению с HCV1, HSV2 и VZV (показан как "η1"). Предпочтительно область вставки содержит по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19 или по меньшей мере 20 остатков и/или является по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 5. В некоторых воплощениях область вставки содержит последовательность, в которой от одного до восьми аминокислотных остатков SEQ ID NO: 5 подвергнуты консервативной замене.

Фраза "подвергнутый консервативной замене" означает, что остаток заменен другим биологически аналогичным остатком. Примеры включают замену аминокислотных остатков с аналогичными характеристиками, например, небольших аминокислот, кислотных аминокислот, полярных аминокислот, основных аминокислот, гидрофобных аминокислот и ароматических аминокислот. Пример консервативных аминокислотных замен включает замены согласно следующей табл. 1 и аналогичные замены исходного остатка неприродными альфа-аминокислотами, которые имеют аналогичные характеристики.

Таблица 1

Исходный остаток	Очень высоко-консервативные замены	Высококонсервативные замены (из Blosum90 Matrix)	Консервативные замены (из Blosum65 Matrix)
Ala	Ser	Gly, Ser, Thr	Cys, Gly, Ser, Thr, Val
Arg	Lys	Gln, His, Lys	Asn, Gln, Glu, His, Lys
Asn	Gln, His	Asp, Gln, His, Lys, Ser, Thr	Arg, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr
Asp	Glu	Asn, Glu	Asn, Gln, Glu, Ser
Cys	Ser	Ни одна	Ala
Gln	Asn	Arg, Asn, Glu, His, Lys, Met	Arg, Asn, Asp, Glu, His, Lys, Met, Ser
Glu	Asp	Asp, Gln, Lys	Arg, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Ser
Gly	Pro	Ala	Ala, Ser
His	Asn, Gln	Arg, Asn, Gln, Tyr	Arg, Asn, Gln, Glu, Tyr
Ile	Leu, Val	Leu, Met, Val	Leu, Met, Phe, Val
Leu	Ile, Val	Ile, Met, Phe, Val	Ile, Met, Phe, Val
Lys	Arg, Gln, Glu	Arg, Asn, Gln, Glu	Arg, Asn, Gln, Glu, Ser
Met	Leu, Ile	Gln, Ile, Leu, Val	Gln, Ile, Leu, Phe, Val
Phe	Met, Leu, Tyr	Leu, Trp, Tyr	Ile, Leu, Met, Trp, Tyr
Ser	Thr	Ala, Asn, Thr	Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Lys, Thr
Thr	Ser	Ala, Asn, Ser	Ala, Asn, Ser, Val
Trp	Tyr	Phe, Tyr	Phe, Tyr
Tyr	Trp, Phe	His, Phe, Trp	His, Phe, Trp
Val	Ile, Leu	Ile, Leu, Met	Ala, Ile, Leu, Met, Thr

Если не определено иное, процент идентичности двух последовательностей определяется по всей длине более короткой из двух последовательностей. 3. Модифицированные белки и комплексы gL CMV

А. Модифицированные белки gL

В одном аспекте согласно изобретению предложен модифицированный белок gL CMV или его фрагмент, образующий комплекс, которые уменьшают разрезание (расщепление) в пептидной связи между остатками N97 и S98.

Гликопротеин L (gL) человеческого CMV кодируется геном UL115. Считается, что gL является существенным для репликации вируса, и все известные функциональные свойства gL прямо ассоциированы с его димеризацией с gH. Комплекс gH/gL требуется для слияния вирусной и плазматической мембран, приводя к проникновению вируса в клетку-хозяина. Сообщали о том, что gL из штамма Merlin HCMV (GL39842115, SEQ ID NO: 1) и штамма Towne HCMV (GL239909463, SEQ ID NO: 2) имеют 278 аминокислот в длину. Сообщали о том, что gL из штамма AD169 HCMV (GL2506510, SEQ ID NO: 3) имеет длину 278 аминокислот, включает сигнальную последовательность на его N-конце (аминокислотные остатки 1-35), имеет два сайта N-гликозилирования (на остатках 74 и 114) и не имеет ТМ (трансмембранного) домена (Rigoutsos I., et al., Journal of Virology 77 (2003): 4326-44). Прогнозируется, что N-концевая сигнальная последовательность в SEQ ID NO: 1 содержит аминокислотные остатки 1-30. SEQ ID NO: 2 имеет 98% идентичности аминокислот с SEQ ID NO: 1. Секвенирование полноразмерного гена gL из 22-39 клинических изолятов, а также лабораторных штаммов AD169, Towne и Toledo выявило менее 2% изменчивости аминокислотной последовательности среди изолятов (Rasmussen L. et al., Journal of Virology 76 (2002): 10841-10888).

Как правило, N-концевая сигнальная последовательность белков gL отщепляется сигнальной пептидазой клетки-хозяина с получением зрелых белков gL. В белках gL в мембранных комплексах HCMV по изобретению могут отсутствовать N-концевые сигнальные последовательности. Примером белка gL, у которого отсутствуют N-концевые сигнальные последовательности, является SEQ ID NO: 4, у которой отсутствует N-концевая сигнальная последовательность, и которая состоит из аминокислотных остатков 31-278 SEQ ID NO: 1.

В то время как считается то, что gL является существенным для вирусной репликации, все известные функциональные свойства gL непосредственно ассоциированы с его димеризацией с gH.

Белки gL по изобретению могут представлять собой варианты gL, которые имеют разные степени идентичности с SEQ ID NO: 1, как, например, являются по меньшей мере на 60, 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93,

94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичными последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. Белки gL по изобретению могут иметь разные степени идентичности с SEQ ID NO: 4, как, например, являются по меньшей мере на 60, 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% или 99% идентичными последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 4. В некоторых воплощениях белки-варианты gL: (1) образуют часть димерного комплекса gH/gL; (2) образуют часть тримерного комплекса gH/gL/gO; (3) образуют часть пентамерного комплекса gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131; (4) содержат по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4; и/или (5) могут индуцировать *in vivo* антитела, которые иммунологически перекрестно реагируют с вирионом CMV.

В данном изобретении также охватываются описанные здесь фрагменты белков gL, образующие комплекс. Фрагмент gL, образующий комплекс, может представлять собой любую часть или область белка gL, которая сохраняет способность образовывать комплекс с другим белком CMV. В некоторых воплощениях фрагмент gL, образующий комплекс, образует часть димерного комплекса gH/gL. В некоторых воплощениях фрагмент gL, образующий комплекс, образует часть тримерного комплекса gH/gL/gO. В некоторых воплощениях фрагмент gL, образующий комплекс, образует часть пентамерного комплекса gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131. Фрагмент gL, образующий комплекс, может быть получен или определен стандартными анализами, известными в данной области техники, такими как анализ ко-иммунопреципитации, поперечного связывания или колокализации посредством флуоресцентного окрашивания и так далее. В некоторых воплощениях фрагмент gL, образующий комплекс, также (1) содержит по меньшей мере один эпитоп из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4; и/или (2) может индуцировать *in vivo* антитела, которые иммунологически перекрестно реагируют с вирионом CMV.

В некоторых воплощениях описанный здесь белок gL или его фрагмент, образующий комплекс, содержит мутацию в сайте распознавания протеазой (остатки 91-102), где указанная мутация уменьшает протеазное расщепление в указанном сайте распознавания протеазой по сравнению с контролем.

Множество контролей может быть использовано. Уровень протеазного расщепления (в пептидной связи между остатками 97 и 98) соответствующего gL дикого типа при по существу тех же самых условиях можно использовать в качестве контроля. В качестве альтернативы, контроль может иметь заданный уровень или пороговый уровень (например, 20, 25 или 30% от общего белка gL). Процентная доля относится к мольной процентной доле.

Например, мутация может приводить к уменьшению протеазного расщепления в пептидной связи между остатками 97 и 98 по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% и так далее, по сравнению с протеазным расщеплением дикого типа, при рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине млекопитающего при стандартных условиях культивирования для данной клетки-хозяина.

Альтернативно или дополнительно, протеазное расщепление уменьшается по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 60 раз, по меньшей мере в 70 раз, по меньшей мере в 75 раз, по меньшей мере в 80 раз, по меньшей мере в 90 раз или по меньшей мере в 100 раз по сравнению с протеазным расщеплением дикого типа при рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине млекопитающего при стандартных условиях культивирования для данной клетки-хозяина.

Альтернативно или дополнительно, мутация может представлять собой мутацию, при которой в пептидной связи между остатками 97 и 98 расщепляется не более чем примерно 35% молекул gL или их фрагментов, образующих комплекс, при рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине млекопитающего при стандартных условиях культивирования для данной клетки-хозяина. Например, данная мутация может приводить к тому, что в пептидной связи между остатками 97 и 98 расщепляется не более чем примерно 35%, не более чем примерно 30%, не более чем примерно 25%, не более чем примерно 20%, не более чем примерно 15%, не более чем примерно 10%, не более чем примерно 9%, не более чем примерно 8%, не более чем примерно 7%, не более чем примерно 6%, не более чем примерно 5%, не более чем примерно 4%, не более чем примерно 3%, не более чем примерно 2% или не более чем примерно 1% молекул gL или их фрагментов, образующих комплекс, при рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине млекопитающего при стандартных условиях культивирования для данной клетки-хозяина. Данная процентная доля относится к мольной процентной доле.

Известны стандартные условия культивирования для обычно используемых клеток-хозяев млекопитающих. Например, для клеток CHO стандартные условия культивирования могут представлять собой температуру 36,5°C в среде с pH 7,0 с содержанием CO₂ не более 10%. В одном конкретном примере клетки Expi293 трансфицировали для экспрессии пентамерного комплекса (gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131) при 37°C и в среде с pH 7,0 с 8% CO₂ в течение трех суток и супернатанты культуры клеток подвергали аффинной очистке и анализировали с использованием вестерн-

блоттинга, как показано в примерах ниже.

Мутация включает вставку, делецию, замену аминокислотного остатка или их комбинацию. Предпочтительно данная мутация по существу сохраняет вторичную структуру С-концевой области сайта распознавания протеазой. В частности, как показано на фиг. 1, остатки С-концевой области указанного сайта распознавания протеазой образуют β -тяж, который, как считается, взаимодействует с другими β -тяжами с образованием β -складчатого слоя. Предпочтительно указанная мутация поддерживает данную конформацию β -тяжа. Потенциальные преимущества поддержания данной вторичной структуры включают, например, облегчение сборки комплексов, содержащих gL (например, gH/gL, gH/gL/gO или gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131), и поддержание ключевых иммуногенных эпитопов. Возможно также сохранение структура короткой петли, непосредственно предшествующей β -тяжу.

Доступны многие компьютерные программы и алгоритмы для прогнозирования вторичной структуры, включающие I-TASSER, HHpred, RaptorX, MODELLER, SWISS-MODEL, Roberta Beta, SPARKSx, PEP-FOLD, Phyre и Phyre2, RAPTOR, QUARK, Abalone, Foldit и так далее. С использованием данных средств можно проанализировать, изменяет ли мутация вторичную структуру сайта распознавания протеазой.

Как показано в примерах, пептидная связь между N97 и S98 расщепляется протеазой; следовательно, введение одного или более чем одного дополнительного остатка между N97 и S98 может приводить к мутанту gL (или фрагменту), который является более устойчивым к расщеплению. В типичном воплощении мутация включает вставку F, Q или их комбинации между остатками 97 и 98. В типичном воплощении мутация включает вставку FQ или QF между остатками 97 и 98.

В некоторых воплощениях мутация включает делецию остатка, выбранного из группы, состоящей из: A95, A96, N97 и их комбинации. В типичном воплощении мутация включает делецию N97.

В некоторых воплощениях мутация включает замену A95 на R, L или N.

В некоторых воплощениях мутация включает замену A96 на I, L или S.

В некоторых воплощениях мутация включает замену N97 полярным остатком или неполярным остатком. Полярный остаток может содержать маленькую боковую цепь или большую боковую цепь. В некоторых воплощениях мутация включает замену N97 на S, D, E, A или Y.

В некоторых воплощениях мутация включает замену S98 аминокислотным остатком с маленькой боковой цепью, таким как G, A, V, S, T, C, D или N. В некоторых воплощениях мутация включает замену S98 на G, T, V или I.

В некоторых воплощениях мутация включает замену V99 аминокислотным остатком I.

В некоторых воплощениях мутация включает замену L100 аминокислотным остатком F или V.

В некоторых воплощениях мутация включает замену L101 аминокислотным остатком V.

Описанные здесь вставка, делеция и замены могут быть использованы по отдельности или в любой комбинации. Например, мутант gL может содержать вставку в одном положении, делецию во втором положении и замену в третьем положении.

В некоторых воплощениях белок gL или фрагмент содержит область вставки на N-конце сайта распознавания протеазой. Как показано на фиг. 1, по сравнению с белками gL из HSV-1, HSV-2 и VZV, белок gL CMV содержит вставку из дополнительных 17 остатков. Как показано в Примерах, при частичной или полной делеции данной вставки из 17 остатков белок gL становится более подверженным протеазному расщеплению. Следовательно, данная вставка из 17 остатков, по-видимому, по меньшей мере частично блокирует доступ протеазы к сайту распознавания протеазой. Следовательно, может быть желательным сохранение области вставки на N-конце сайта распознавания протеазой. "Область вставки" должна иметь длину по меньшей мере 10 аминокислотных остатков и является по меньшей мере на 50% идентичной SEQ ID NO: 5 (которая представляет собой исходный фрагмент из 17 остатков, уникальный для gL CMV, по сравнению с HSV1, HSV2 и VZV).

В некоторых воплощениях мутация включает введение не встречающегося в природе аминокислотного остатка, который, как считается, уменьшает протеазное расщепление.

В некоторых воплощениях мутация включает введение аминокислотного остатка, содержащего объемную боковую цепь, который, как считается, по меньшей мере частично блокирует доступ протеазы к сайту распознавания протеазой и уменьшает протеазное расщепление.

Б. Комплексы белков CMV

В другом аспекте согласно изобретению предложен описанный здесь комплекс, содержащий модифицированный белок gL CMV или его фрагмент, образующий комплекс. Такие комплексы включают, например, (1) выделенные димерные комплексы, содержащие: описанные здесь модифицированный белок gL или его фрагмент, образующий комплекс, и белки gH CMV или их фрагменты, образующие комплекс; (2) выделенный тримерный комплекс, содержащий описанные здесь модифицированный белок gL или его фрагмент, образующий комплекс, белки gH CMV или их фрагменты, образующие комплекс, и gO или его фрагмент, образующий комплекс; и (3) выделенные пентамерные комплексы, содержащие описанные здесь модифицированный белок gL или его фрагмент, образующий комплекс, и белки pUL128 CMV или его фрагмент, образующий комплекс, pUL130 или его фрагмент, образующий комплекс,

pUL131 или его фрагмент, образующий комплекс, и gH или его фрагмент, образующий комплекс. Также включены любые другие комплексы, содержащие gL (или его фрагмент, образующий комплекс) в качестве компонента.

Хотя gH, gL, gO, pUL128, pUL130 и pUL131 могут называться гликопротеинами, данную номенклатуру не следует учитывать для обозначения того, что данные белки обязательно должны быть гликозилированными при использовании в данном изобретении. Напротив, в некоторых воплощениях изобретения один или более чем один полипептид не является гликозилированным. Однако обычно один или более полипептидов (или все) в комплексе по изобретению являются гликозилированными. В некоторых воплощениях один или более полипептидов (или все) в комплексе по изобретению являются гликозилированными мутантами по гликозилированию культивируемых клеток, такими как мутировавшие клетки млекопитающих. Такие мутанты по гликозилированию дают картину гликозилирования полипептидов, которая отличается от картины гликозилирования дикого типа, то есть образующиеся гликоформы полипептидов отличаются от гликоформ дикого типа.

В некоторых воплощениях картина гликозилирования gL (или его фрагмента, образующего комплекс) или комплекса, содержащего gL (или его фрагмента, образующего комплекс) имеет картину гликозилирования млекопитающих; и/или не имеет картины гликозилирования клеток насекомых. В некоторых воплощениях один или более чем один белок комплекса содержит сложные N-связанные боковые цепи с предпоследней галактозой и концевой сиаловой кислотой.

Для рекомбинантной продукции белковых комплексов (таких как пентамерный комплекс) может быть желательным, чтобы данный комплекс был растворимым. На основе анализа последовательности белок gH CMV содержит трансмембранный (ТМ) домен, но gL, gO, pUL128, pUL130 и pUL131 не имеют трансмембранных доменов. Таким образом, для получения растворимого комплекса (например, пентамерного комплекса) субъединица gH пентамерного комплекса может не содержать домен ТМ. Например, можно использовать фрагмент gH, содержащий N-концевую сигнальную последовательность и эктодомен, но не ТМ домен gH.

gH из штамма Towne CMV показан как SEQ ID NO: 6 (GI: 138314, 742 аминокислотных остатка). gH из Towne был охарактеризован как имеющий: (1) шесть сайтов N-гликозилирования (на остатках 55, 62, 67, 192, 641 и 700); (2) гидрофобную сигнальную последовательность на его N-конце (аминокислотные остатки 1-23); (3) эктодомен (остатки 24-717), который выступает из клетки во внеклеточное пространство; (4) гидрофобный трансмембранный (ТМ) домен (остатки 718-736) и (5) C-концевой цитоплазматический домен (остатки 737-742). ТМ домены белков gH из других штаммов или других вариантов и фрагментов gH могут быть идентифицированы согласно выравниванию последовательности.

Для легкости продуцирования рекомбинантно продуцированный комплекс CMV (такой как пентамерный комплекс) может секретироваться из клетки-хозяина в культуральную среду.

В некоторых воплощениях указанный пентамерный комплекс секретируется из клетки-хозяина. Сообщали о том, что присутствие всех пяти субъединиц: gH, gL, pUL128, pUL131 и pUL131 является достаточным для сборки пентамерного комплекса в ЭР (эндоплазматический ретикулум) перед тем, как он экспортируется в аппарат Гольджи. См., Ryckman et al., J Virol. Jan 2008; 82(1): 60-70. Альтернативно или дополнительно, в одной или более чем одной из пяти субъединиц может использоваться подходящий сигнальный пептид (например, посредством получения слитого белка с секреторным сигналом). В предшествующем уровне техники известны сигнальные последовательности (и экспрессионные кассеты) для продуцирования секреторных белков. В общем, лидерные пептиды имеют длину 5-30 аминокислот и обычно присутствуют на N-конце вновь синтезированного белка. Ядро сигнального пептида обычно содержит длинный отрезок гидрофобных аминокислот, которые имеют тенденцию образовывать одну альфа-спираль. Кроме того, многие сигнальные пептиды начинаются с короткого положительно заряженного отрезка аминокислот, который может помочь принять правильную топологию полипептида во время транслокации. В конце сигнального пептида, как правило, имеется отрезок аминокислот, который распознается и отщепляется сигнальной пептидазой. Сигнальная пептидаза может отщеплять либо во время, либо после завершения транслокации с получением свободного сигнального пептида и зрелого белка.

В. Нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированные белки gL и комплексы

В другом аспекте согласно изобретению предложена нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, которая кодирует модифицированный белок gL или его фрагмент, образующий комплекс, описанные в данном документе. Данная нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК или РНК.

В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. Основанные на ДНК экспрессионные системы для экспрессии и очистки рекомбинантных белков хорошо известны в данной области техники. Например, экспрессионная система может представлять собой вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует модифицированный gL или фрагмент gL, описанный в данном документе, которая связана функциональным образом с последовательностью контроля экспрессии, которая регулирует экспрессию модифицированного gL или фрагмента gL в клетке-хозяине, такой как клетка-хозяин млекопитающего, бактериальная клетка-хозяин или клетка-хозяин насекомого. Последовательность контроля экспрессии может представлять собой, например, промотор, энхансер, сайт посадки рибосомы или последовательность полиаденилирования. Другие последовательности кон-

троля экспрессии, рассматриваемые для применения в изобретении, включают последовательности интронов и 3' UTR (3'-нетранслируемая область).

Рекомбинантно экспрессируемый модифицированный белок gL или его фрагмент, или комплекс, содержащий модифицированный белок gL или его фрагмент, могут быть очищены с использованием описанных здесь способов, таких как способы очистки, раскрытые в WO 2014/005959, или других способов, известных в данной области техники.

В некоторых воплощениях молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вектор, происходящий из аденовируса, аденоассоциированного вируса, лентивируса или альфавируса. В некоторых воплощениях молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вирусный вектор, дефицитный по репликации.

В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота представляет собой РНК. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота представляет собой самореплицирующуюся молекулу РНК, такую как РНК-репликон, происходящий из альфавируса.

Самореплицирующиеся молекулы РНК хорошо известны в данной области техники и могут продуцироваться с использованием элементов репликации, происходящих из, например, альфавирусов, и заменены структурных вирусных белков нуклеотидной последовательностью, кодирующей интересующий белок. Самореплицирующаяся молекула РНК типично представляет собой молекулу плюс-нити, которая может непосредственно транслироваться после доставки в клетку, и эту трансляцию обеспечивает РНК-зависимая РНК-полимераза, которая затем продуцирует из доставленной РНК и антисмысловые, и смысловые транскрипты. Таким образом, доставленная РНК приводит к продуцированию многочисленных дочерних РНК. Данные дочерние РНК, а также коллинеарные субгеномные транскрипты могут сами транслироваться с обеспечением экспрессии *in situ* кодируемого антигена или могут транскрибироваться с предоставлением дополнительных транскриптов, имеющих такую же смысловую структуру, что и доставленная РНК, которая транслируется с обеспечением экспрессии антигена *in situ*. Общим результатом этой последовательности транскрипций является огромное увеличение числа введенных РНК-репликонов и, таким образом, кодируемый антиген становится главным полипептидным продуктом клеток. Клетки, трансфицированные самореплицирующейся РНК, кратковременно продуцируют антиген, после чего подвергаются апоптозной гибели. Эта гибель, вероятно, является результатом соответствующих двухцепочечных (дц) промежуточных РНК, которые, как также было показано, сверхактивируют дендритные клетки. Таким образом, усиленная иммуногенность самореплицирующихся РНК может быть результатом продукции провоспалительных дцРНК, которые имитируют инфекцию клеток-хозяев РНК-вирусом.

Одной подходящей системой для достижения саморепликации этим способом является применение репликона на основе альфавируса. Альфавирусы включают набор генетически, структурно и серологически родственных вирусов, передаваемых членистоногими, из семейства *Togaviridae*. В пределах рода альфавирусов были классифицированы двадцать шесть известных вирусов и подтипов вирусов, включая вирус Синдбис, вирус леса Семлики, вирус реки Росс и вирус венесуэльского лошадиного энцефалита. Самореплицирующаяся РНК по изобретению как таковая может включать РНК-репликазу, происходящую из вируса леса Семлики (SFV), вируса Синдбис (SIN), вируса венесуэльского лошадиного энцефалита (VEE), вируса реки Росс (RRV), вируса восточного лошадиного энцефалита или других вирусов, принадлежащих к семейству альфавирусов.

В данном изобретении могут быть использованы "репликонные" экспрессионные векторы на основе альфавируса. Репликонные векторы могут быть использованы в нескольких форматах, включая ДНК, РНК и рекомбинантные репликонные частицы. Такие репликонные векторы были получены из альфавирусов, которые включают, например, вирус Синдбис (Xiong et al. (1989) *Science* 243:1188-1191; Dubensky et al. (1996) *J. Virol.* 70:508-519; Hariharan et al. (1998) *J. Virol.* 72:950-958; Polo et al. (1999) *PNAS* 96:4598-4603), вирус леса Семлики (Liljestrom (1991) *Bio/Technology* 9:1356-1361; Berglund et al. (1998) *Nat. Biotech.* 16:562-565) и вирус венесуэльского лошадиного энцефалита (Pushko et al. (1997) *Virology* 239: 389-401). Репликоны, происходящие из альфавирусов, обычно являются довольно сходными в общих характеристиках (например, структура, репликация), индивидуальные альфавирусы могут демонстрировать некоторое особенное свойство (например, связывание с рецептором, чувствительность к интерферону и профиль заболеваний), которое является уникальным. Следовательно, химерные репликоны альфавирусов, полученные из семейств дивергентных вирусов, также могут быть полезными.

В некоторых воплощениях описанные здесь белки gL CMV (или их фрагменты) доставляются с использованием репликонных частиц альфавирусов (VRP). "Репликонная частица альфавируса" (VRP) или "репликонная частица" представляет собой репликон альфавируса, упакованный со структурными белками альфавирусов.

Применения РНК-репликонов на основе альфа-вирусов известны в данной области техники, см., например, WO 2013006837, абзацы от [0155] до [0179]. РНК-репликон может быть введен без необходимости очистки кодируемого им белка.

В некоторых воплощениях молекула нуклеиновой кислоты является частью вектора, происходящего из аденовируса. Геном аденовируса представляет собой линейную двухцепочечную молекулу ДНК из

приблизительно 36000 пар оснований с 55 кДа концевым белком, ковалентно связанным с 5'-концом каждой нити. Аденовирусная ("Ad") ДНК содержит идентичные инвертированные концевые повторы ("ITR") из примерно 100 пар оснований с точной длиной, зависящей от серотипа. Вирусные репликаторы локализируются в пределах ITR точно на концах генома. Аденовирусные векторы для применения в настоящем изобретении могут быть получены из любого из разнообразных аденовирусных серотипов, включая, без ограничения, любой из более чем 40 штаммов серотипов аденовирусов, таких как серотипы 2, 5, 12, 40 и 41.

В некоторых воплощениях молекула нуклеиновой кислоты представляет собой часть вектора, происходящего из аденоассоциированного вируса (AAV). Геном AAV представляет собой линейную одноцепочечную молекулу ДНК, содержащую приблизительно 4681 нуклеотидов. Геном AAV обычно содержит внутренний неповторяющийся геном, фланкированный на каждом конце инвертированными концевыми повторами (ITR). ITR имеют длину приблизительно 145 пар оснований (п.о.). ITR имеют многочисленные функции, включающие их функционирование в качестве точек начала репликации ДНК и в качестве упаковочных сигналов для вирусного генома. AAV представляет собой вирус, зависимый от хелпера; то есть, он требует совместного инфицирования хелперным вирусом (например, аденовирусом, вирусом герпеса или вирусом осповакцины) для того, чтобы образовать вирионы AAV в природных условиях. В отсутствие совместного инфицирования хелперным вирусом у AAV устанавливается латентное состояние, в котором вирусный геном встраивается в хромосому клетки-хозяина, но инфекционные вирионы не продуцируются. Последующее инфицирование хелперным вирусом спасает интегрировавшийся геном, обеспечивая его репликацию и упаковку его генома в инфекционные вирионы AAV. В то время как AAV может инфицировать клетки из разных видов, хелперный вирус должен принадлежать к тому же самому виду, что и клетка-хозяин. Таким образом, например, человеческий AAV будет реплицироваться в собачьих клетках, совместно инфицированных собачьим аденовирусом.

В некоторых воплощениях молекула нуклеиновой кислоты является частью вектора, происходящего из ретровирусов. Выбранный ген может быть вставлен в вектор и упакован в ретровирусные частицы с использованием методик, известных в данной области техники. Рекомбинантный вирус может затем быть выделен и доставлен в клетки субъекта либо *in vivo*, либо *ex vivo*. Был описан целый ряд ретровирусных систем. См., например, патент США № 5219740; Miller and Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-90; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1: 5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180: 849-52; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8033-37; Boris-Lawrie and Temin (1993) *Curr. Opin. Genet. Develop.* 3:102-09.

Согласно изобретению также предложены клетки-хозяева, содержащие раскрытые здесь молекулы нуклеиновой кислоты. Клетки-хозяева, подходящие для содержания молекул нуклеиновой кислоты и/или экспрессии рекомбинантных белков, и способы введения нуклеиновой кислоты в подходящую клетку-хозяина известны в данной области техники.

4. Рекомбинантное продуцирование белков gL и комплексов

Согласно изобретению также предложена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновые кислоты, кодирующие белок gL и его фрагмент, как описано выше.

Предпочтительно клетки-хозяева представляют собой клетки млекопитающих (например, человека, приматов, не являющихся человеком, лошади, коровы, овцы, собаки, кошки и грызуна (например хомяка), клетки птиц (например курицы, утки и гусей). Подходящие клетки млекопитающих включают, например, клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки человеческой эмбриональной почки (клетки HEK-293, типично трансформированные усеченной ДНК аденовируса типа 5), клетки NIH-3T3, клетки 293-T, клетки Vero, клетки HeLa, клетки PERC.6 (номер депонирования ECACC 96022940), клетки Her G2, MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), фетальные клетки легкого макака-резуса (ATCC CL-160), коровьи клетки почки Мадин-Дарби ("MDBK"), лошадиные клетки почки Мадин-Дарби ("MDCK") (например, MDCK (NBL2), ATCC CCL34 или MDCK 33016, DSM ACC 2219), клетки почки новорожденного хомяка (BHK), такие как BHK21-F, клетки HKCS и тому подобное.

В некоторых воплощениях клетка-хозяин представляет собой клетку HEK-293. В некоторых воплощениях клетка-хозяин представляет собой клетку CHO. В некоторых воплощениях полинуклеотид, кодирующий белок gL (или его фрагмент), описанный здесь, интегрируется в геномную ДНК клетки CHO. Для рекомбинантного продуцирования белкового комплекса CMV нуклеотидная последовательность, кодирующая другие субъединицы комплекса, также должна быть интегрирована в геномную ДНК клетки CHO.

Соответственно, в некоторых воплощениях клетка-хозяин содержит одну или более чем одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую пентамерный комплекс CMV, содержащий gH или его фрагмент, образующий пентамер, gL или его фрагмент, образующий пентамер, pUL128 или его фрагмент, образующий пентамер, pUL130 или его фрагмент, образующий пентамер, и pUL131 или его фрагмент, образующий пентамер. В некоторых воплощениях одна или более чем одна полинуклеотидная последовательность, кодирующая пентамерный комплекс CMV, интегрируется в геномную ДНК указанной клетки-хозяина. В некоторых воплощениях клетка-хозяин при культивировании при подходящих условиях экспрессирует указанный пентамерный комплекс CMV (который предпочтительно является раство-

рым и/или секретируемым из клетки-хозяина).

Типичные линии клеток CHO, доступные в Европейской коллекции клеточных культур (ECACC), перечислены в табл. 2. Могут быть использованы любые клетки CHO, перечисленные в табл. 2.

Таблица 2

Название линии клеток	Ключевые слова
CHO	Яичник китайского хомяка
CHO (не содержащие белка)	Яичник китайского хомяка
CHO-CHRM1	Человеческий холинергический рецептор мускариновый M1, CHRM1, рецептор, сопряженный с G-белком, GPCR, трансфицированный, InSCREENeX SCREENflex™, хозяин CHO-K1
CHO-CHRM2	Человеческий холинергический рецептор мускариновый M2, CHRM2, рецептор, сопряженный с G-белком, GPCR, трансфицированный, InSCREENeX SCREENflex™, хозяин CHO-K1
CHO-CHRM5	Человеческий холинергический рецептор мускариновый M5, CHRM5, рецептор, сопряженный с G-белком, GPCR, трансфицированный, InSCREENeX SCREENflex™, хозяин CHO-K1
CHO-CNR1	Человеческий каннабиноидный рецептор I, CNR1 ID гена 1268, рецептор, сопряженный с G-белком, GPCR, трансфицированный, InSCREENeX SCREENflex™, хозяин CHO-K1
CHO-FFAR2	Человеческий рецептор 2, не содержащий жирных кислот, FFAR2, рецептор, сопряженный с G-белком, GPCR, трансфицированный, InSCREENeX SCREENflex™, хозяин CHO-K1
CHO-GPR120	человеческий рецептор GPR120 (орфановый), GPR120, рецептор, сопряженный с G-белком, GPCR, трансфицированный, InSCREENeX SCREENflex™, хозяин CHO-K1
CHO-K1	яичник китайского хомяка
CHO-K1-AC-free	яичник китайского хомяка, бессывороточный
CHO-K1/SF	яичник китайского хомяка (адаптированный к MEM (минимальная поддерживающая среда))
CHO-NPY1R	человеческий рецептор нейропептида Y, NPY1R, ID гена 4886, рецептор, сопряженный с G-белком, GPCR, трансфицированный, InSCREENeX SCREENflex™, хозяин CHO-K1
CHO-OPRL1	человеческий опиатный рецептороподобный 1, OPRL1, рецептор, сопряженный с G-белком, GPCR, трансфицированный, InSCREENeX SCREENflex™, хозяин CHO-K1
CHO-SSTR1	человеческий рецептор соматостатина 1, SSTR1, рецептор, сопряженный с G-белком, GPCR, трансфицированный, InSCREENeX SCREENflex™, хозяин CHO-K1
CHO/dhFr-	яичник китайского хомяка
CHO/dhFr-AC-free	яичник китайского хомяка, бессывороточный
RR-CHOK1	яичник китайского хомяка
T02J-10/10 (CHO-GCGR (GCGR))	человеческий рецептор глюкагона, GCGR, рецептор, сопряженный с G-белком, GPCR, трансфицированный, InSCREENeX SCREENflex™, хозяин CHO-K1

Разные линии клеток CHO также доступны из Американской коллекции типовых клеточных культур (ATCC), такие как линии клеток CHO hCBE11 (ATCC®)

PTA-3357™), E77.4 (ATCC® PTA-3765™), hLT-B: R-hG1 CHO #14 (ATCC® CRL-11965™), MOR-CHO- MORAb-003-RCB (ATCC® PTA-7552™), клон 11B AQ.C2 (ATCC® PTA-3274™), клон 11B AQ.C2 (ATCC® PTA-3274™), hsAQC2 в CHO-DG44 (ATCC® PTA-3356™), xrs5 (ATCC® CRL-2348™), CHO-K1 (ATCC® CCL-61™), Lec1 [исходно названная Pro-5WgaRI3C] (ATCC® CRL-1735™), Pro-5 (ATCC® CRL-1781™), ACY1-E (ATCC® 65421™), ACY1-E (ATCC® 65420™), pgsE-606 (ATCC® CRL-2246™), CHO-CD36 (ATCC® CRL-2092™), pgsC-605 (ATCC® CRL-2245™), MC2/3 (ATCC® CRL-2143™), CHO-ICAM-1 (ATCC® CRL-2093™) и pgsB-618 (ATCC® CRL-2241™).

Можно использовать любую из данных линий клеток CHO.

Другие имеющиеся в продаже линии клеток CHO включают, например, клетки CHO-S FreeStyle™ и линию клеток Flp-In™-CHO от Life Technologies.

Другие подходящие клетки-хозяева включают, например, клетку CHO, в которой уровень экспрессии или активность белка C12orf35 снижены по сравнению с контролем (см., например, WO2015/092735, включенный в данное описание посредством ссылки, в котором приведено подробное описание клеток млекопитающих, в которых уровень экспрессии или активность белка C12orf35 снижены по сравнению с контролем), клетку CHO, в которой уровень экспрессии или активность белка FAM60A снижены по сравнению с контролем (см., например, WO2015/092737, включенный в данное описание посредством ссылки, в котором приведено подробное описание клеток млекопитающих, в которых уровень экспрессии или активность белка FAM60A снижены); клетку CHO, в которой уровень экспрессии или активность матрипазы снижены по сравнению с контролем (предварительная заявка на патент США № 61/985589, поданная 29 апреля 2014 г. и включенная в данное описание посредством ссылки, и предварительная заявка на патент США № 61/994310, поданная 16 мая 2014 г. и включенная в данное описание посредством ссылки, дают подробное описание клеток млекопитающих, в которых уровень экспрессии или активность матрипазы снижены).

Способы обеспечения экспрессии рекомбинантных белков в клетках CHO в общем были раскрыты, см., например, в патентах США № 4816567 и № 5981214.

В патентной заявке EP 14191385.5, поданной 31 октября 2014 г. (включенной в данное описание посредством ссылки) раскрыты клетки-хозяева млекопитающих, в частности, клетки CHO, в которых последовательность(и), кодирующая(ие) белки CMV gH, gL, pUL128, pUL130, pUL131 (или их фрагмент, образующий комплекс) является(ются) стабильно интегрированной(ыми) в геном.

Также здесь раскрыта культура клеток, содержащая описанные здесь клетки-хозяева. Данная культура клеток может быть крупномасштабной, например по меньшей мере примерно 10 л, по меньшей мере примерно 20 л, по меньшей мере примерно 30 л, по меньшей мере примерно 40 л, по меньшей мере примерно 50 л, по меньшей мере примерно 60 л, по меньшей мере примерно 70 л, по меньшей мере примерно 80 л, по меньшей мере примерно 90 л, по меньшей мере примерно 100 л, по меньшей мере примерно 150 л, по меньшей мере примерно 200 л, по меньшей мере примерно 250 л, по меньшей мере примерно 300 л, по меньшей мере примерно 400 л, по меньшей мере примерно 500 л, по меньшей мере примерно 600 л, по меньшей мере примерно 700 л, по меньшей мере примерно 800 л, по меньшей мере примерно 900 л, по меньшей мере примерно 1000 л, по меньшей мере примерно 2000 л, по меньшей мере примерно 3000 л, по меньшей мере примерно 4000 л, по меньшей мере примерно 5000 л, по меньшей мере примерно 6000 л, по меньшей мере примерно 10000 л, по меньшей мере примерно 15000 л, по меньшей мере примерно 20000 л, по меньшей мере примерно 25000 л, по меньшей мере примерно 30000 л, по меньшей мере примерно 35000 л, по меньшей мере примерно 40000 л, по меньшей мере примерно 45000 л, по меньшей мере примерно 50000 л, по меньшей мере примерно 55000 л, по меньшей мере примерно 60000 л, по меньшей мере примерно 65000 л, по меньшей мере примерно 70000 л, по меньшей мере примерно 75000 л, по меньшей мере примерно 80000 л, по меньшей мере примерно 85000 л, по меньшей мере примерно 90000 л, по меньшей мере примерно 95000 л, по меньшей мере примерно 100000 л и так далее.

В некоторых воплощениях выход комплекса CMV (такого как пентамерный комплекс) составляет по меньшей мере примерно 0,01 г/л, по меньшей мере примерно 0,02 г/л, по меньшей мере примерно 0,03 г/л, по меньшей мере примерно 0,05 г/л, по меньшей мере примерно 0,06 г/л, по меньшей мере примерно 0,07 г/л, по меньшей мере примерно 0,08 г/л, по меньшей мере примерно 0,09 г/л, по меньшей мере примерно 0,1 г/л, по меньшей мере примерно 0,15 г/л, по меньшей мере примерно 0,20 г/л, по меньшей мере примерно 0,25 г/л, по меньшей мере примерно 0,3 г/л, по меньшей мере примерно 0,35 г/л, по меньшей мере примерно 0,4 г/л, по меньшей мере примерно 0,45 г/л, по меньшей мере примерно 0,5 г/л, по меньшей мере примерно 0,55 г/л, по меньшей мере примерно 0,6 г/л, по меньшей мере примерно 0,65 г/л, по меньшей мере примерно 0,7 г/л, по меньшей мере примерно 0,75 г/л, по меньшей мере примерно 0,8 г/л, по меньшей мере примерно 0,85 г/л, по меньшей мере примерно 0,9 г/л, по меньшей мере примерно 0,95 г/л или по меньшей мере примерно 1,0 г/л.

Также здесь раскрыт способ получения белка gL цитомегаловируса (CMV) или его фрагмента или комплекса, содержащего указанный белок gL или фрагмент, включающий: (1) культивирование описанных здесь клеток-хозяев при подходящих условиях, экспрессируя посредством этого указанный белок gL или его фрагмент; и (2) сбор указанного белка gL или его фрагмента или комплекса, содержащего указанный белок gL или фрагмент, из культуры.

В некоторых воплощениях белок gL (или его фрагмент) или комплекс, содержащий описанные здесь указанный белок gL или фрагмент, очищают. Белок gL (или его фрагмент) можно очищать с использованием любых подходящих способов, таких как ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография), разные типы хроматографии (такие как хроматография, основанная на гидрофобном взаимодействии, ионообменная, аффинная, с использованием хелаторов и гель-фильтрация), электрофорез, центрифугирование в градиенте плотности, экстрагирование растворителем или тому подобное.

Например, ионообменную хроматографию можно использовать для очистки белка gL (или его фрагмента) или комплекса, содержащего указанный белок gL или фрагмент. Примеры веществ, полезных в ионообменной хроматографии, включают DEAE-целлюлозу, QAE-целлюлозу, DEAE-цефалозу, QAE-цефалозу, DEAE-Toyopearl, QAE-Toyopearl, Mono Q, Mono S, Q сефарозу, SP сефарозу и так далее. В одном типичном воплощении в данном способе используют колонку Mono S. В другом типичном воплощении в данном способе используют колонку Mono Q.

Альтернативно или дополнительно можно использовать очистку на основе аффинности. Примеры меток для аффинной очистки включают, например, His метку (связывается с ионом металла), антитело (связывается с белком А или белком G), мальтозосвязывающий белок (MBP) (связывается с амилозой), глутатион-S-трансферазу (GST) (связывается с глутатионом), метку FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys) (SEQ ID NO: 8) (связывается с антителом против FLAG), метку Strep (связывается со стрептавидином или его производным).

Одним типичным воплощением является метка Strep (или стрептавидиновая аффинная метка), представляющая собой метку, которая связывается со стрептавидином или его производным, таким как Strep-Tactin. Метка Strep содержит пептид из девяти аминокислот: Ala-Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO: 9) или восьми аминокислот (также называемая меткой strep-II): Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 10). Элюцию белка, прикрепившегося к метке strep, из колонки можно проводить с использованием биотина или его производного или гомолога, такого как дестибиотин.

Метка для аффинной очистки может быть присоединена любыми подходящими способами и может быть присоединена прямо или опосредованно. Например, метка может быть ковалентно присоединена по N-концу полипептидной последовательности или по C-концу полипептидной последовательности. Это может быть достигнуто рекомбинантной экспрессией слитого белка, содержащего полипептид и метку, или стандартными методиками конъюгирования, в которых полипептид связывается с меткой. Метка может быть присоединена к функциональной группе боковой цепи аминокислотного остатка полипептида с использованием стандартных методик конъюгирования. В качестве альтернативы, метка может быть присоединена нековалентно.

Присоединение метки может быть прямым или опосредованным (через линкер). Подходящие линкеры известны специалистам в данной области техники и включают, например, углеводные линкеры с прямой или разветвленной цепью, линкеры с гетероциклическим углеродом, углеводные линкеры и полипептидные линкеры.

В определенном воплощении для присоединения интересующей молекулы к метке можно использовать расщепляемые линкеры. Это обеспечивает отделение метки от очищенного комплекса, например, посредством добавления агента, способного расщеплять линкер. Целый ряд разных расщепляемых линкеров известен специалистам в данной области техники. Такие линкеры могут быть отщеплены, например, посредством облучения фотолабильной связи или гидролизом, катализируемым кислотой. Также существуют полипептидные линкеры, которые включают сайт распознавания протеазой, и которые могут расщепляться при добавлении подходящего протеазного фермента.

При очистке комплекса, содержащего белок gL (или его фрагмент), метка может быть присоединена к другому(им) компоненту(ам) комплекса. Например, при очистке пентамерного комплекса CMV метка может быть присоединена к pUL128, pUL130 или pUL131.

5. Фармацевтические композиции и введение

В изобретении также раскрыты фармацевтические композиции, содержащие описанные здесь белки CMV, комплексы и нуклеиновые кислоты. В изобретении также раскрыты фармацевтические композиции, содержащие описанную здесь нуклеиновую кислоту, кодирующую белки CMV, комплексы и нуклеиновые кислоты.

Описанные здесь белки CMV, комплексы и нуклеиновые кислоты могут быть включены в иммуногенную композицию или вакцинную композицию. Такие композиции могут быть использованы для индукции антител у млекопитающего (например человека).

В изобретении раскрыты фармацевтические композиции, содержащие описанные здесь белки CMV, комплексы и нуклеиновые кислоты, и способы изготовления фармацевтической композиции, включающие объединение описанных здесь белков CMV, комплексов и нуклеиновых кислот с фармацевтически

приемлемым носителем. Фармацевтические композиции по изобретению обычно включают фармацевтически приемлемый носитель, и обстоятельное обсуждение таких носителей доступно в Remington: The Science and Practice of Pharmacy.

Значение pH композиции обычно составляет от примерно 4,5 до примерно 11, как, например, от примерно 5 до примерно 11, от примерно 5,5 до примерно 11, от примерно 6 до примерно 11, от примерно 5 до примерно 10,5, от примерно 5,5 до примерно 10,5, от примерно 6 до примерно 10,5, от примерно 5 до примерно 10, от примерно 5,5 до примерно 10, от примерно 6 до примерно 10, от примерно 5 до примерно 9,5, от примерно 5,5 до примерно 9,5, от примерно 6 до примерно 9,5, от примерно 5 до примерно 9, от примерно 5,5 до примерно 9, от примерно 6 до примерно 9, от примерно 5 до примерно 8,5, от примерно 5,5 до примерно 8,5, от примерно 6 до примерно 8,5, от примерно 5 до примерно 8, от примерно 5,5 до примерно 8, от примерно 6 до примерно 8, примерно 4,5, примерно 5, примерно 5,5, примерно 6, примерно 6,5, примерно 7, примерно 7,5, примерно 8, примерно 8,5, примерно 9, примерно 9,5, примерно 10, примерно 10,5, примерно 11 и так далее. Стабильный pH может поддерживаться с использованием буфера, например, буфера Tris, цитратного буфера, фосфатного буфера или гистидинового буфера. Таким образом, композиция обычно будет включать буфер.

Композиция может быть стерильной и/или апиrogenной. Композиции могут быть изотоничными для людей.

Композиция содержит иммунологически эффективное количество ее антигена(ов). "Иммунологически эффективное количество" представляет собой количество, которое при введении субъекту является эффективным для индукции антительного ответа против антигена. Данное количество может варьировать в зависимости от здоровья и физического состояния индивида, подлежащего лечению, его возраста, способности иммунной системы индивида синтезировать антитела, желательной степени защиты, состава вакцины, оценки медицинской ситуации лечащим врачом и других релевантных факторов. Ожидается, что данное количество будет попадать в относительно широкий интервал, который может быть определен рутинными исследованиями. Содержание антигена в композициях по изобретению обычно будет выражаться в показателях массы белка на дозу. Полезной может быть доза 10-500 мкг (например 50 мкг) на антиген.

Иммуногенные композиции могут включать иммунологический адъювант. Типичные адъюванты включают композиции, содержащие минералы; масляные эмульсии; препараты сапонины; виросомы и вирусоподобные частицы; бактериальные или микробные производные; биоадгезивные и мукоадгезивные агенты; липосомы; препараты простого эфира полиоксиэтилена и сложного эфира полиоксиэтилена; полифосфазен (рсрр); мурамилпептиды; имидазохинолоновые соединения; тиосемикарбазоновые соединения; соединения трипантрина; человеческие иммуномодуляторы; липопептиды; бензонафтиридины; микрочастицы; иммуностимулирующий полинуклеотид (такой как РНК или ДНК; например CpG-содержащие олигонуклеотиды).

Например, композиция может включать адъювант на основе соли алюминия, эмульсию типа "масло-в-воде" (например, эмульсию типа "масло-в-воде", содержащую сквален, такой как MF59 или AS03), агонист TLR7 (толл-подобный рецептор 7) (такой как имидазохинолин или имиквимод) или их комбинацию. Подходящие соли алюминия включают гидроксиды (например оксигидроксиды), фосфаты (например гидроксифосфаты, ортофосфаты) (например, см. главы 8 и 9 Vaccine Design (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum) или их смеси. Данные соли могут принимать любую подходящую форму (например форму геля, кристаллическую, аморфную и так далее) с адсорбцией антигена на соли в качестве примера. Концентрация Al^{+3} в композиции для введения пациенту может быть менее 5 мг/мл, например, менее 4 мг/мл, менее 3 мг/мл, менее 2 мг/мл, менее 1 мг/мл и так далее. Предпочтительный интервал составляет от 0,3 до 1 мг/мл. Предпочтительным является максимум 0,85 мг/дозу. Подходящими для применения в данном изобретении являются адъюванты на основе гидроксида алюминия и фосфата алюминия.

Один подходящий иммунологический адъювант содержит соединение формулы (I), как определено в WO 2011/027222, или его фармацевтически приемлемую соль, адсорбированные на соли алюминия. Могут быть использованы многие другие адъюванты, включая любой из адъювантов, раскрытых в Powell & Newman (1995).

Композиции могут включать противомикробное средство, в частности, при упаковке в многодозовом формате. В вакцинах обычно находятся противомикробные средства, такие как тимеросал и 2-феноксизанол, но иногда может быть желательным использовать либо консервант, не содержащий ртути, либо вообще не использовать консервант.

Композиции могут содержать детергент, например полисорбат, такой как полисорбат 80. Детергенты обычно присутствуют в низких концентрациях, например менее 0,01%.

Для придания тоничности композиции могут включать натриевые соли (например, хлорид натрия). Типичной является концентрация 10 ± 2 мг/мл NaCl, например примерно 9 мг/мл.

В изобретении раскрыт способ индуцирования иммунного ответа против цитомегаловируса (CMV), включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, иммунологически эффективного количества описанной здесь иммуногенной композиции, которая содержит белки, молекулы ДНК, молекулы РНК

(например самореплицирующиеся молекулы РНК) или VRP, как описано выше.

В некоторых воплощениях иммунный ответ включает продуцирование нейтрализующих антител против CMV. В некоторых воплощениях нейтрализующие антитела являются комплементнезависимыми.

Иммунный ответ может включать гуморальный иммунный ответ, клеточно-опосредованный иммунный ответ или и тот, и другой. В некоторых воплощениях иммунный ответ индуцируется против каждого доставленного белка CMV. Клеточно-опосредованный иммунный ответ может включать ответ хелперных Т-клеток (Th), ответ цитотоксических Т-клеток (CTL) CD8+ или и тот, и другой. В некоторых воплощениях иммунный ответ включает гуморальный иммунный ответ и антитела представляют собой нейтрализующие антитела. Нейтрализующие антитела блокируют вирусную инфекцию клеток. CMV инфицирует эпителиальные клетки, а также клетки-фибробласты. В некоторых воплощениях иммунный ответ уменьшает или предупреждает инфекцию обоих типов клеток. Ответы нейтрализующих антител могут быть комплементзависимыми или комплементнезависимыми. В некоторых воплощениях ответ нейтрализующих антител является комплементнезависимым. В некоторых воплощениях ответ нейтрализующих антител является перекрестно нейтрализующим; то есть, антитело, генерированное против введенной композиции, нейтрализует вирус CMV штамма, отличного от штамма, используемого в композиции. Полезной мерой эффективности антитела, используемой в данной области техники, является "титр 50%-ной нейтрализации". Для определения титра 50%-ной нейтрализации сыворотку от иммунизированных животных разводят для оценки того, как разведенная сыворотка все еще может сохранять способность блокировать проникновение 50% вирусов в клетки. Например, титр 700 означает, что сыворотка сохраняла способность нейтрализовать 50% вируса после 700-кратного разведения. Таким образом, более высокие титры указывают на более мощные ответы нейтрализующих антител. В некоторых воплощениях данный титр находится в интервале, имеющем нижнюю границу примерно 200, примерно 400, примерно 600, примерно 800, примерно 1000, примерно 1500, примерно 2000, примерно 2500, примерно 3000, примерно 3500, примерно 4000, примерно 4500, примерно 5000, примерно 5500, примерно 6000, примерно 6500 или примерно 7000. Интервал титра 50%-ной нейтрализации может иметь верхнюю границу примерно 400, примерно 600, примерно 800, примерно 1000, примерно 1500, примерно 2000, примерно 2500, примерно 3000, примерно 3500, примерно 4000, примерно 4500, примерно 5000, примерно 5500, примерно 6000, примерно 6500, примерно 7000, примерно 8000, примерно 9000, примерно 10000, примерно 11000, примерно 12000, примерно 13000, примерно 14000, примерно 15000, примерно 16000, примерно 17000, примерно 18000, примерно 19000, примерно 20000, примерно 21000, примерно 22000, примерно 23000, примерно 24000, примерно 25000, примерно 26000, примерно 27000, примерно 28000, примерно 29000 или примерно 30000. Например, титр 50%-ной нейтрализации может составлять от примерно 3000 до примерно 25000. "Примерно" означает плюс или минус 10% от указанного значения.

Композиции по изобретению обычно будут введены непосредственно субъекту. Непосредственная доставка может быть осуществлена парентеральной инъекцией (например, подкожно, внутрибрюшинно, внутривенно, внутримышечно или в интерстициальное пространство ткани) или любым другим подходящим путем. Например, можно использовать внутримышечное введение, например в бедро или в плечо. Инъекция может быть осуществлена через иглу (например подкожную иглу), однако в качестве альтернативы, может быть использована безыгольная инъекция. Типичный объем внутримышечной дозировки составляет примерно 0,5 мл.

Дозировка может быть осуществлена посредством однократной схемы или многократной схемы. Многократные дозы можно использовать в схеме первичной иммунизации и/или в схеме повторной иммунизации. В многократной схеме разные дозы можно давать одним и тем же путем или разными путями, например, парентеральная первичная иммунизация и повторная иммунизация через слизистую, первичная иммунизация через слизистую и парентеральная повторная иммунизация и так далее. Многократные дозы типично будут введены с интервалом по меньшей мере 1 неделя (например, примерно 2 недели, примерно 3 недели, примерно 4 недели, примерно 6 недель, примерно 8 недель, примерно 10 недель, примерно 12 недель, примерно 16 недель и так далее).

Субъект может представлять собой животное, предпочтительно позвоночное, более предпочтительно млекопитающее. Типичный субъект включает, например, человека, корову, свинью, курицу, кошку или собаку, поскольку охватываемые здесь патогены могут представлять проблему для широкого спектра видов. Когда вакцина предназначена для профилактического применения, человек предпочтительно представляет собой ребенка (например, ребенка, начинающего ходить, или младенца), подростка или взрослого; когда вакцина предназначена для терапевтического применения, человек предпочтительно представляет собой подростка или взрослого. Вакцина, предназначенная для детей, также может быть введена взрослым, например, для оценки безопасности, дозировки, иммуногенности и так далее.

Вакцины по изобретению могут быть профилактическими (то есть для предупреждения заболевания) или терапевтическими (то есть для уменьшения или устранения симптомов заболевания). Термин "профилактический" может рассматриваться как уменьшающий тяжесть или предупреждающий начало конкретного состояния. Во избежание сомнений, термин "профилактическая вакцина" также может относиться к вакцинам, которые уменьшают интенсивность эффектов будущей инфекции, например, посредством уменьшения тяжести или продолжительности такой инфекции.

Выделенные и/или очищенные описанные здесь белки CMV, комплексы и нуклеиновые кислоты могут быть введены сами по себе или в виде комплексных схем первичной или повторной иммунизации, таких как первичная иммунизация РНК с последующей повторной иммунизацией белком. Польза стратегии первичной иммунизации РНК с повторной иммунизацией белком по сравнению со стратегией первичной и повторной иммунизации белком включает, например, повышенные титры антител, более сбалансированный профиль подтипов IgG1:IgG2a, индукцию опосредованного Т-клетками CD4+ иммунного ответа TH1 типа, который был аналогичным иммунному ответу на вирусные частицы, и пониженное продуцирование ненейтрализующих антител. Первичная иммунизация РНК может увеличивать иммуногенность композиций независимо от того, содержат ли они адъювант или не содержат его.

В стратегии первичной иммунизации РНК с повторной иммунизацией белком РНК и белок направлены против одного и того же антигена-мишени. Примеры подходящих способов доставки РНК включают частицы вирусоподобного репликона (VRP), РНК альфавируса, репликоны, инкапсулированные в липидные наночастицы (LNP), или приготовленные в виде препарата РНК, такие как репликоны, приготовленные с катионными наноэмульсиями (CNE). Подходящие катионные наноэмульсии типа "масло-в-воде" раскрыты в WO 2012/006380, например, содержащие масляное ядро (например, содержащее сквален) и катионный липид (например, DOTAP, DMTAP, DSTAP, DC-холестерин и так далее).

В WO 2012/051211 раскрыто, что антитела к пентамерному комплексу продуцируются у мышей, которые были иммунизированы VRP и приготовлены в виде препарата РНК (CNE и LNP), которые кодируют белковые компоненты пентамерного комплекса. Было обнаружено, что данные антитела способны нейтрализовать инфекцию CMV в эпителиальных клетках. Схема первичной иммунизации РНК с повторной иммунизацией белком может включать сначала (например, в недели 0-8) проведение одной или более чем одной первичной иммунизации РНК (которая могла быть доставлена в виде VRP, LNP, CNE и так далее), которая кодирует один или более чем один белковый компонент белкового комплекса CMV по изобретению, и затем последующее проведение одной или более чем одной повторной иммунизации (например, в недели 24-58) с использованием: выделенного белкового комплекса CMV по изобретению, возможно приготовленного с адъювантом, или очищенного белкового комплекса CMV по изобретению, возможно приготовленного с адъювантом.

В некоторых воплощениях молекула РНК инкапсулируется в, связывается с или адсорбируется на катионном липиде, липосоме, кохлеате, виросоме, иммуностимулирующем комплексе, микрочастице, микросфере, наносфере, однослойной везикуле, многослойной везикуле, эмульсии типа "масло-в-воде", эмульсии типа "вода-в-масле", эмульсоне, поликатионном пептиде, катионной наноэмульсии или их комбинациях.

Также здесь раскрыты наборы для введения описанных здесь нуклеиновой кислоты (например, РНК), очищенных белков и очищенных комплексов и инструкции для применения. В изобретении также раскрыто устройство для доставки, предварительно заполненное раскрытыми здесь композицией или вакциной.

Описанные здесь фармацевтические композиции могут быть введены в комбинации с одним или более чем одним дополнительным терапевтическим агентом. Дополнительные терапевтические агенты могут включать антибиотики или антибактериальные агенты, противорвотные агенты, противогрибковые агенты, противовоспалительные агенты, иммуномодулирующие агенты, цитокины, антидепрессанты, гормоны, алкилирующие агенты, антиметаболиты, противоопухолевые антибиотики, антимитотические агенты, ингибиторы топоизомеразы, цитостатические агенты, антиинвазивные агенты, антиангиогенные агенты, ингибиторы функции фактора роста, ингибиторы вирусной репликации, ингибиторы вирусных ферментов, противораковые агенты, α -интерфероны, β -интерфероны, рибавирин, гормоны и другие модуляторы Толл-подобных рецепторов, иммуноглобулины (Ig) и антитела, модулирующие функцию Ig (такие как антитела против IgE (омализумаб)).

В некоторых воплощениях раскрытые здесь композиции могут быть использованы в качестве лекарственного средства, например, для применения в индуцировании или усилении иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, такого как млекопитающее.

В некоторых воплощениях раскрытые здесь композиции могут быть использованы в изготовлении лекарственного средства для индуцирования или усиления иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, такого как млекопитающее.

Один способ проверки эффективности терапевтического лечения включает мониторинг инфекции патогеном после введения раскрытых здесь композиций или вакцин. Другой способ проверки эффективности профилактического лечения включает мониторинг иммунных ответов против антигена: системно (как, например, мониторингом уровня продуцирования IgG1 и IgG2a) и/или на уровне слизистой (как, например, мониторингом уровня продуцирования IgA). Типично антигенспецифичные сывороточные антительные ответы определяют после иммунизации, но до заражения, тогда как антигенспецифичные антительные ответы на уровне слизистой определяют после иммунизации и после заражения.

Данное изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует истолковывать как ограничивающие.

Примеры

Пример 1: Материалы и методы

Анализ последовательности и структуры.

Последовательности gL CMV, VZV, HSV1 и HSV2 выравнивали с использованием CLUSTALW (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html) и корректировали вручную для выравнивания остатков, вносящих вклад в консервативные β -тяжи в VZV и HSV2.

Экспрессия комплекса пента и gH/gL.

Пентамерный комплекс ("пента") дикого типа (WT) или пента с мутациями gL (мутант "LSG" и "IDG") экспрессировали с использованием двух векторных систем с gH и gL в одном векторе и трех UL в другом. Последовательность IRES (внутренний сайт посадки рибосомы) разделяет разные гены в каждом векторе. gH имеет С-концевую 6xHis метку (SEQ ID NO: 11), и UL130 имеет расщепляемую С-концевую метку strep. ДНК двух векторов с 1 мг общей ДНК для каждого литра культуры трансфицировали в клетки Expi293 с использованием трансфекционного набора Expiectamine (Life Technologies), следуя протоколу изготовителя. Клетки выращивали во встряхиваемых колбах до примерно $2,5 \times 10^6$ клеток/мл в сутки трансфекции с жизнеспособностью более 97%. Трансфицированные клетки выращивали в течение трех суток до примерно 8×10^6 клеток/мл с жизнеспособностью примерно 60% во встряхиваемом инкубаторе, работающем при 37°C, 150 об/мин и 8% CO₂. Супернатанты экспрессионных сред отбирали центрифугированием при 4200 об/мин в течение 30 мин.

gH/gL WT или gH/gL с мутациями gL экспрессировали с использованием вектора, содержащего и gH, и gL таким же способом, как описано выше.

N-концевое секвенирование.

N-концевое секвенирование использовали для идентификации неизвестных полос, видимых на гелях SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) и вестерн-блотах (WB) аффинно очищенного пента WT. Пента на геле SDS-PAGE переносили на мембрану PVDF (поливинилиденфторид), активированную этанолом, которую окрашивали 0,02% кумасси бриллиантовым синим в 40% метаноле, затем несколько раз промывали в дистиллированной воде перед полной сушкой на воздухе. Интересующие полосы вырезали и отправляли в Профильный центр белка Университета Тафтса для секвенирования.

Очистка и анализ вестерн-блоттингом.

Отобранный супернатант концентрировали и осуществляли в нем замену буфера на связывающий буфер для аффинной колонки (50 mM Hepes, pH 7,0, 150 mM NaCl и 1 mM EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота)) с использованием системы KrosFlo Research II TFF и картриджа на основе полых волокон (Spectrumlabs). Концентрированный супернатант загружали на картридж StrepTrap HP (GE Life Sciences) и элюировали элюирующим буфером (50 mM Hepes, pH 7,0, 150 mM NaCl, 2,5 mM дестиобиотин и 1 mM EDTA). Фракции пиков из элюата анализировали SDS-PAGE и вестерн-блоттингом с использованием антител против либо gL, либо метки His, локализованной на С-конце gH.

Исследования иммунизации у мышей.

Десять мышей на группу иммунизировали очищенным пентамерным комплексом WT или мутантным пентамерным комплексом gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 с адъювантом MF59 в трех разных дозах 0,03, 0,1 и 1 мкг с тремя инъекциями с трехнедельными интервалами. Образцы сыворотки инактивировали нагреванием при 56°C в течение 30 мин, серийно разводили в два раза на каждом этапе (два повторения на разведение), смешивали с равным объемом вируса HCMV, разведенным до целевой концентрации 200-250 инфицированных клеток/поле для подсчета в среде плюс/минус компонент морской свинки (Cedarlane Labs, Burlington, NC, США) и инкубировали в течение 2 ч при 37°C/5% CO₂. Данные образцы сыворотки/вируса добавляли к клеткам ARPE-19 или клеткам MRC-5, приготовленным в 96-луночных планшетах для культуры клеток с половинной площадью (Corning Inc., Corning, NY, США). Инфицированные монослои инкубировали в течение 48 ч (плюс/минус 8 ч) при 37°C/5% CO₂, фиксировали 10%-ным забуференным формалином (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, США) в течение одного часа и три раза промывали промывочным буфером (PBS (фосфатно-солевой буферный раствор)/0,05% Tween-20), блокировали PBS/2,5%-ной фетальной телячьей сывороткой, 0,5%-ным сапонином, 0,1%-ным азидом натрия в течение одного часа при комнатной температуре. Планшеты промывали три раза, просушивали при помощи полосок фильтровальной бумаги и инкубировали во влажном инкубаторе при 25°C в течение одного часа. Планшеты затем инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с антителом против Ш1 HCMV, полученным из гибридомы L14 (разведенным в буфере с сапонином). Планшеты промывали три раза и инкубировали в течение одного часа с антителом против мышиного IgG, конъюгированным с AlexaFluor 488 (разведенным в буфере с сапонином), и затем три раза промывали PBS/0,05% Tween-20. Флуоресцентные клетки подсчитывали с использованием УФ (ультрафиолетовый) анализатора S5 для метода иммуноферментных пятен (Cellular Technology Limited, Shaker Heights, OH, США), и титр 50%-ной нейтрализации, определенный как обратное значение разведения сыворотки, дающего 50%-ное уменьшение числа инфицированных клеток (по отношению к числу инфицированных клеток в разбавителе плюс лунках с вирусным контролем), рассчитывали полученной при помощи ли-

нейной регрессии интерполяцией между двумя разведениями с использованием лунок, дающих среднее число инфицированных клеток выше и ниже значения 50%.

Пример 2. Результаты

1. Разрезание gL происходит рядом с консервативным β -тяжем

N-концевым секвенированием определили, что полоса, идентифицированная вестерн-блоттингом с использованием антитела gL, начинается с остатка 97 gL. Таким образом, пентамерный комплекс gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131, экспрессируемый в клетках млекопитающих, содержит популяцию белков gL, разрезанных между остатками Asn97 и Ser98 gL. Выравниванием последовательности на основе структуры дополнительно обнаружили, что сайт разрезания находится в области петли рядом с консервативным β -тяжем в структурах gH/gL как VZV, так и HCV-2 (фиг. 1).

Разные мутации, введенные в последовательность gL рядом с этим сайтом разрезания, приводили к уменьшению уровня разрезания gL. Инсерционные мутации вставляли в сайт расщепления между остатками два и пять с использованием смеси полярных и неполярных остатков. Делеционные мутации осуществляли делецию от одного до трех остатков около сайта расщепления. Заменяющие мутации приводили к замене Ala96 на гидрофобные остатки или остатки с большими боковыми цепями; замене Asn97 на полярные остатки либо с меньшими, либо с большими боковыми цепями, либо на неполярные остатки; или замене Ser98 на остатки с меньшими боковыми цепями, имеющими либо полярные, либо неполярные характеристики.

2. Сравнение разных мутантов gH/gL с gH/gL дикого типа

На фиг. 2A показаны разные мутантные белки gL, которые тестировали. Комплексы gH/gL, содержащие разные мутации gL, экспрессировали в клетках Expi293 и сравнивали с gH/gL WT. Мутации в сайте распознавания протеазой уменьшали разрезание gL в экспрессируемых комплексах gH/gL. Например, вестерн-блоттинг против gL неочищенного супернатанта WT показал ясно видимую полосу фрагмента gL с остатком 98 на его N-конце при определении N-концевым секвенированием. В отличие от этого, аналогичную полосу не выявляли у мутанта "LSG", и она либо не выявлялась, либо значительно ослабевала у мутантов "дельта Asn97" и "SST" (фиг. 2).

Варианты с тремя остатками, введенными рядом с сайтом разрезания, уменьшали разрезание в большей степени, чем вариант с одним остатком рядом с сайтом разрезания. Мутант "LSG" наиболее значительно уменьшал интенсивность полосы разрезания gL на вестерн-блоте с антителом против His. Кроме того, удаление вставки из 17 остатков усиливало интенсивность полосы разрезания gL, наблюдаемой вестерн-блоттингом, gH/gL(N), свидетельствуя о том, что данная вставка может защищать сайт расщепления (фиг. 2B).

3. Сравнение мутантного пента "LSG" и "IDG" с пентамером дикого типа

Для анализа того, устраняли или уменьшали ли мутанты "LSG" и "IDG" разрезание gL в пентамере gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131, аффинно очищенные WT и мутантный пентамеры анализировали вестерн-блоттингом с антителом против His и антителом против gL. На вестерн-блоте пентамера WT с использованием антитела против His имеется отчетливая полоса с меньшей молекулярной массой, чем у полноразмерного gH/gL, что согласуется с комплексом gH и N-концевой области gL после разрезания. Отмечено, что данный N-концевой фрагмент gL не распознается антителом против gL. На вестерн-блоте с использованием антитела против gL C-концевая область gL, начиная с остатка 98, как определено N-концевым секвенированием, образует комплекс с UL128 в невосстановленном образце. Тот же самый C-концевой фрагмент как таковой наблюдали в восстановленном образце. В отличие от этого, те полосы, которые образуются в результате разрезания gL, не выявлялись ни в "LSG", ни в "IDG" мутантных пентамерах (фиг. 3 и 4). И "LSG", и "IDG" мутанты продуцировали пентамер, который вел себя аналогично пентамерному комплексу WT. Следовательно, данные мутации не влияют на сборку пентамерного комплекса gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131, но они устраняли протеолитическое разрезание белка gL (фиг. 5 A).

Анализ иммуногенности показал, что мутации LSG и IDG не нарушали иммуногенность пентамерного комплекса gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 (фиг. 5B).

Фрагмент gL, который формировался в результате разрезания, выявляли во время экспрессии комплексов gH/gL, gH/gL/gO (данные не показаны) и gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131. Сайты разрезания в данных трех комплексах являются идентичными: между остатками 97 и 98 gL. Следовательно, мутации, которые предотвращают разрезание gL во время экспрессии gH/gL, также предотвращают разрезание gL во время экспрессии gH/gL/gO и пентамерного gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131 комплексов.

С заменами всего лишь трех остатков или одной делецией разрезание gL может, соответственно, устраняться или значительно уменьшаться. Не ожидается, что локализация данных мутаций влияет на консервативную вторичную структуру рядом с ними. Это обеспечивает продуцирование гомогенного пентамера gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131, главным образом, с неизменными его трехмерной структурой и антигенностью/иммуногенностью. Авторы изобретения сделали заключение, что стратегия мутирования последовательности рядом с сайтом разрезания с гомологичной последовательностью оказалась эффективной.

Разные признаки и воплощения настоящего изобретения, относящиеся к индивидуальным разделам, приведенным выше, применимы, в зависимости от ситуации, к другим разделам с внесением необходимых изменений. Следовательно, признаки, определенные в одном разделе, могут быть объединены с признаками, определенными в других разделах, в зависимости от ситуации.

Данное описание изобретения лучше всего понятно в свете идей из источников информации, процитированных в данном описании изобретения. Воплощения в пределах описания изобретения дают иллюстрацию воплощений изобретения, и их не следует истолковывать как ограничивающие объем изобретения. Квалифицированный специалист легко поймет, что данным изобретением охватываются многие другие воплощения. Все публикации и патенты, процитированные в данном раскрытии, включены посредством ссылки во всей полноте. В той степени, в которой материал, включенный посредством ссылки, противоречит или не согласуется с данным описанием изобретения, описание изобретения будет лишать силы любой такой материал. Цитирование здесь любых ссылок не является допущением того, что такие ссылки являются предшествующим уровнем техники по отношению к настоящему изобретению.

В воплощении настоящего изобретения на практике будут использованы, если не указано иное, традиционные способы химии, биохимии, молекулярной биологии, иммунологии и фармакологии, в пределах квалификации специалиста в данной области. Такие методики в полной мере описаны в литературе. Термин "содержащий" охватывает "включающий", а также "состоящий", например, композиция, "содержащая" X, может состоять исключительно из X или может включать что-то дополнительное, например X плюс Y.

Термин "по существу состоящий из" означает, что композиция, способ или структура могут включать дополнительные ингредиенты, стадии и/или части, но только если эти дополнительные ингредиенты, стадии и/или части материально не изменяют базовые и новые характеристики заявленной композиции, способа или структуры. Обычно принимается, что термин "состоящий из" означает то, что изобретение, как заявлено, ограничивается теми элементами, которые конкретно перечислены в формуле изобретения (и может включать их эквиваленты, в такой мере, в которой применима доктрина эквивалентов).

Специалисты в данной области знают или смогут установить с использованием не более чем рутинного экспериментирования многие описанные здесь эквиваленты конкретных воплощений изобретения. Подразумевается то, что такие эквиваленты охватываются следующими воплощениями.

1. Рекомбинантный белок gL цитомегаловируса или его фрагмент, который сохраняет способность к образованию комплекса с другим белком цитомегаловируса, причем указанный белок gL или фрагмент содержит сайт распознавания протеазой в остатках 91-102, пронумерованных согласно SEQ ID NO: 1, и мутацию в указанном сайте распознавания протеазой, где указанная мутация уменьшает протеазное расщепление в указанном сайте распознавания протеазой по сравнению с белком gL дикого типа и представляет собой:

- а) вставку F, Q, FQ или QF между остатками N97 и S98;
- б) делецию остатка, выбранного из группы, состоящей из A95, A96, N97 и их комбинации;
- в) замену A96 на I, L, V или S;
- г) замену A95 на R, L, E или N;
- д) замену N97 на полярный остаток или неполярный остаток;
- е) замену S98 на аминокислотный остаток с маленькой боковой цепью;
- ж) замену V99 на I;
- з) замену L100 аминокислотным остатком F или V;
- и) замену L101 аминокислотным остатком V или I; или комбинацию вышеуказанного.

2. Белок gL или его фрагмент по воплощению 1, где указанная в (д) замена N97 представляет собой замену на полярный остаток, содержащий маленькую боковую цепь.

3. Белок gL или его фрагмент по любому из воплощений 1-2, где указанная в (д) замена N97 представляет собой замену на полярный остаток, содержащий большую боковую цепь.

4. Белок gL или его фрагмент по любому из воплощений 1-3, где указанная в (е) замена S98 представляет собой замену на G, T, V или I.

5. Белок gL или фрагмент по любому из воплощений 1-4, где три или более чем три остатка указанного сайта распознавания протеазой образуют β -тяж, и указанная мутация поддерживает конформацию β -тяжа.

6. Белок gL или фрагмент по любому из воплощений 1-5, где указанная мутация приводит к не более чем 20% (молярная процентная концентрация) gL, расщепленного в указанном сайте распознавания протеазой при рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине млекопитающего.

7. Белок gL или фрагмент по любому из воплощений 1-6, где указанный белок gL или фрагмент содержит область вставки по N-концу сайта распознавания протеазой.

8. Цитомегаловирусный комплекс, обладающий уменьшенным протеазным расщеплением и содер-

жащий: рекомбинантный белок gL или его фрагмент по любому из воплощений 1-7 и белок gH или его фрагмент.

9. Комплекс по воплощению 8, представляющий собой пентамерный комплекс, дополнительно содержащий белок pUL128 или его фрагмент, белок pUL130 или его фрагмент и белок pUL131 или его фрагмент.

10. Комплекс по воплощению 8 или 9, где указанный комплекс представляет собой комплекс gH/gL, содержащий gH или его фрагмент, образующий комплекс, и gL или его фрагмент, образующий комплекс.

11. Комплекс по воплощению 8 или 9, где указанный комплекс представляет собой тримерный комплекс, содержащий gH или его фрагмент, образующий комплекс, gL или его фрагмент, образующий комплекс, и gO или его фрагмент, образующий комплекс.

12. Иммуногенная композиция, содержащая рекомбинантный белок gL цитомегаловируса или его фрагмент по любому из воплощений 1-7 или цитомегаловирусный комплекс по любому из воплощений 8-11.

13. Иммуногенная композиция по воплощению 12, дополнительно содержащая адъювант.

14. Иммуногенная композиция по воплощению 13, где указанный адъювант содержит соль алюминия, агонист TLR7, эмульсию типа "масло-в-воде" или их комбинацию.

15. Иммуногенная композиция по воплощению 14, где указанная эмульсия типа "масло-в-воде" представляет собой MF59.

16. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный белок gL цитомегаловируса или фрагмент по любому из воплощений 1-7.

17. Выделенная нуклеиновая кислота по воплощению 16, где указанная выделенная нуклеиновая кислота представляет собой РНК, предпочтительно самореплицирующуюся РНК.

18. Выделенная нуклеиновая кислота по воплощению 17, где указанная самореплицирующаяся РНК представляет собой репликон альфавируса.

19. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из воплощений 16-18.

20. Клетка-хозяин по воплощению 19, представляющая собой клетку млекопитающего.

21. Клетка-хозяин по любому из воплощений 19 и 20, где указанная клетка-хозяин дополнительно содержит одну или более чем одну нуклеотидную последовательность, кодирующую gH или его фрагмент, pUL128 или его фрагмент, pUL130 или его фрагмент и pUL131 или его фрагмент.

22. Клетка-хозяин по воплощению 19, где указанная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

23. Клетка-хозяин по воплощению 20, где указанная клетка млекопитающего представляет собой клетку СНО или клетку НЕК-293.

24. Клетка-хозяин по воплощению 22, где указанная ДНК, кодирующая белок gL CMV или его фрагмент, интегрируется в геномную ДНК указанной клетки-хозяина.

25. Клетка-хозяин по воплощению 21, где указанная одна или более чем одна полинуклеотидная последовательность, кодирующая пентамерный комплекс CMV, интегрируется в геномную ДНК указанной клетки-хозяина.

26. Клетка-хозяин по воплощению 21 или 25, где указанная клетка, при культивировании при подходящих условиях, экспрессирует указанный пентамерный комплекс CMV.

27. Клетка-хозяин по воплощению 26, где указанный пентамерный комплекс секретируется.

28. Применение иммуногенной композиции по любому из воплощений 12-15 для индуцирования иммунного ответа против цитомегаловируса (CMV).

Последовательности**SEQ ID NO: 1 (gL из штамма Merlin HCMV = GI:39842115)**

MCRRPDCGFSFSPGPVILLWCCLLLPIVSSAAVSVAPTAAEKVPAECPELTRRCLLGEVFEG
 DKYESWLRPLVNVTRDGPPLSQLIRYRPVTPEAANSVLLDEAFDLTLALLNNPDQLRALLT
 LLSSDTAPRWMTVMRGYSECGDGSPAVYTCVDDLCRGYDLTRLSYGRSIFTEHVLGFELVPP
 SLFNVVVAIRNEATRTRAVRLPVSTAAAPGKITLFYGLYNAVKEFCLRHLQDLPPLLRHLDK
 YYAGLPPELKQTRVNLPASRYGPQAVDAR

SEQ ID NO: 2 (gL из штамма Towne HCMV = GI:239909463)

MCRRPDCGFSFSPGPVALLWCCLLLPIVSSATVSVAPTAAEKVPAECPELTRRCLLGEVFQG
 DKYESWLRPLVNVTRDGPPLSQLIRYRPVTPEAANSVLLDDAFDLTLALLNNPDQLRALLT
 LLSSDTAPRWMTVMRGYSECGDGSPAVYTCVDDLCRGYDLTRLSYGRSIFTEHVLGFELVPP
 SLFNVVVAIRNEATRTRAVRLPVSTAAAPGKITLFYGLYNAVKEFCLRHLQDLPPLLRHLDK
 YYAGLPPELKQTRVNLPASRYGPQAVDAR

SEQ ID NO: 3 (gL из штамма AD169 HCMV = GI:2506510)

MCRRPDCGFSFSPGPVLLWCCLLLPIVSSVAVSVAPTAAEKVPAECPELTRRCLLGEVFQG
 DKYESWLRPLVNVTRDGPPLSQLIRYRPVTPEAANSVLLDDAFDLTLALLNNPDQLRALLT
 LLSSDTAPRWMTVMRGYSECGDGSPAVYTCVDDLCRGYDLTRLSYGRSIFTEHVLGFELVPP
 SLFNVVVAIRNEATRTRAVRLPVSTAAAPGKITLFYGLYNAVKEFCLRHLQDLPPLLRHLDK
 YYAGLPPELKQTRVNLPASRYGPQAVDAR

SEQ ID NO: 4 (зрелый белок gL, состоящий из аминокислотных остатков 31-278 SEQ ID NO: 1)

AAVSVAPTAAEKVPAECPELTRRCLLGEVFEGDKYESWLRPLVNVTRDGPPLSQLIRYRPVT
 PEAANSVLLDEAFDLTLALLNNPDQLRALLTLLSSDTAPRWMTVMRGYSECGDGSPAVYTC
 VDDLCRGYDLTRLSYGRSIFTEHVLGFELVPPSLFNVVVAIRNEATRTRAVRLPVSTAAAP
 EGKITLFYGLYNAVKEFCLRHLQDLPPLLRHLDKYYAGLPPELKQTRVNLPASRYGPQAVDAR

SEQ ID NO: 5 (вставка из 17 остатков из gL из штамма Merlin HCMV)

GRDGPLSQLIRYRPVTP

SEQ ID NO: 6 (gH из штамма Towne HCMV = GI:138314)

MRPGLPSYLIVLAVCLLSHLLSSRYGAEAISEPLDKAFHLLNTYGRPIRFLRENTTQCTYN
 SSLRNSTVVRENAISFNFFQSYNQYYVFHMPRCLFAGPLAEQFLNQVDLTETLERYQQRLNT
 YALVSKDLASYSFSQQKKAQDSLGEQPTTVPPIDLSIPHVWMPPTTPHGWTESHTTSGL
 HRPHFNQTCILFDGHDLLFSTVTPCLHQGFYLI DELRYVKITLTEDFFVVTVSIDDDTPMLL
 IFGHLPRVLFKAPYQRDNFILRQTEKHELLVLVKKDQLNRHSYKDPDFLDAALDFNYLDLS
 ALLRNSFHRYAVDVLKSGRCQMLDRRTVEMAFAYALALFAAARQEEAGAQVSVPRALDRQAA
 LLQIQEFMITCLSQTTPRTTLLLYPTAVDLAKRALWTPNQITDITSLVRLVYILSKQNQQHL
 IPQWALRQIADFALKLHKTHLASFLSAFARQELYLMGSLVHSMVLVHTTERREIFIVETGLCS
 LAELSHFTQLLAHPHHEYLSDYTPCSSSGRRDHSLERLTRLFPDATVPTTVPAAALSILSTM
 QPSTLETFPDLFCLPLGESFSALTVEHVSYYVTNQYLIKGISYPVSTTVVGQSLIITQTDS
 QTKCELTRNMHTTHSITAALNISLENCAFCQSALLEYDDTQGVINIMYMHSDDDVLFALDPY
 NEVVVSSPRTHYLMMLKNGTVLEVTDVVVDATDSRLLMMSVYALSIIIGIYLLYRMLKTC

SEQ ID NO: 7 (вставка из 6 остатков из gL из штамма Merlin HCMV)

NSVLLD

SEQ ID NO: 8 (метка FLAG)

DYKDDDDK

SEQ ID NO: 9 (метка Strep)

AWRHPQFGG

SEQ ID NO: 10 (метка Strep II)

WSHPQFEK

SEQ ID NO: 11 (метка His)

HHHHHH

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный белок gL цитомегаловируса или его фрагмент, который сохраняет способность к образованию комплекса с другим белком цитомегаловируса, причем указанный белок gL или фрагмент содержит сайт распознавания протеазой в остатках 91-102, пронумерованных согласно SEQ ID NO: 1, и мутацию в указанном сайте распознавания протеазой, где указанная мутация уменьшает протеазное рас-

щепление в указанном сайте распознавания протеазой по сравнению с белком gL дикого типа и представляет собой:

- а) вставку F, Q, FQ или QF между остатками N97 и S98;
- б) делецию остатка, выбранного из группы, состоящей из A95, A96, N97 и их комбинации;
- в) замену A96 на I, L, V или S;
- г) замену A95 на R, L, E или N;
- д) замену N97 на полярный остаток или неполярный остаток;
- е) замену S98 на аминокислотный остаток с маленькой боковой цепью;
- ж) замену V99 на I;
- з) замену L100 аминокислотным остатком F или V;
- и) замену L101 аминокислотным остатком V или I или комбинацию вышеуказанного.

2. Белок gL или его фрагмент по п.1, где указанная в (д) замена N97 представляет собой замену на полярный остаток, содержащий маленькую боковую цепь.

3. Белок gL или его фрагмент по любому из пп.1, 2, где указанная в (д) замена N97 представляет собой замену на полярный остаток, содержащий большую боковую цепь.

4. Белок gL или его фрагмент по любому из пп.1-3, где указанная в (е) замена S98 представляет собой замену на G, T, V или I.

5. Рекомбинантный белок gL цитомегаловируса или его фрагмент, который сохраняет способность к образованию комплекса с другим белком цитомегаловируса, причем указанный белок gL или фрагмент содержит сайт распознавания протеазой в остатках 91-102, пронумерованных согласно SEQ ID NO: 1, и мутацию в указанном сайте распознавания протеазой, где указанная мутация уменьшает протеазное расщепление в указанном сайте распознавания протеазой по сравнению с белком gL дикого типа и представляет собой тройную мутацию A96L/N97S/S98G.

6. Рекомбинантный белок gL цитомегаловируса или его фрагмент, который сохраняет способность к образованию комплекса с другим белком цитомегаловируса, причем указанный белок gL или фрагмент содержит сайт распознавания протеазой в остатках 91-102, пронумерованных согласно SEQ ID NO: 1, и мутацию в указанном сайте распознавания протеазой, где указанная мутация уменьшает протеазное расщепление в указанном сайте распознавания протеазой по сравнению с белком gL дикого типа и представляет собой тройную мутацию A96I/N97D/S98G.

7. Цитомегаловирусный комплекс, обладающий уменьшенным протеазным расщеплением и содержащий рекомбинантный белок gL или его фрагмент по любому из пп.1-6 и белок gH или его фрагмент.

8. Комплекс по п.7, представляющий собой пентамерный комплекс, дополнительно содержащий белок pUL128 или его фрагмент, белок pUL130 или его фрагмент и белок pUL131 или его фрагмент.

9. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный белок gL цитомегаловируса или фрагмент по любому из пп.1-6.

10. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.9.

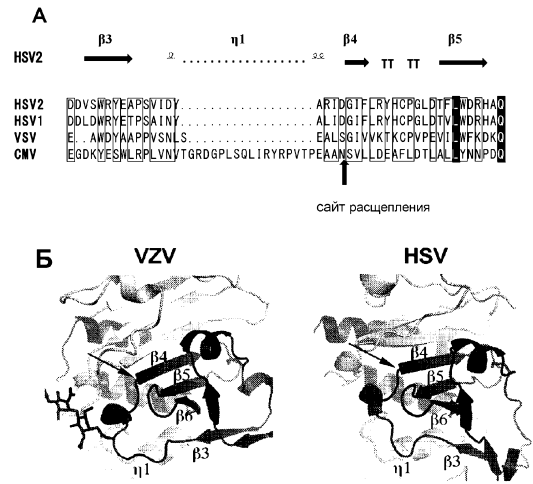
11. Клетка-хозяин по п.10, представляющая собой клетку млекопитающего.

12. Клетка-хозяин по любому из пп.10 и 11, где указанная клетка-хозяин дополнительно содержит одну или более чем одну нуклеотидную последовательность, кодирующую gH или его фрагмент, pUL128 или его фрагмент, pUL130 или его фрагмент и pUL131 или его фрагмент.

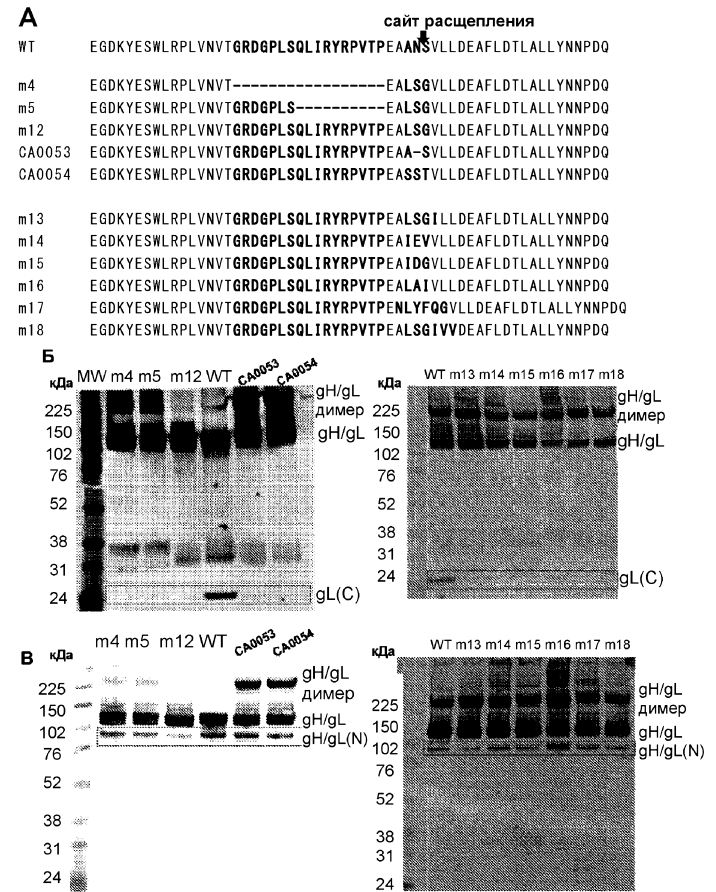
13. Иммуногенная композиция, содержащая рекомбинантный белок gL цитомегаловируса или его фрагмент по любому из пп.1-6 или цитомегаловирусный комплекс по любому из пп.7-8.

14. Иммуногенная композиция по п.13, дополнительно содержащая адъювант.

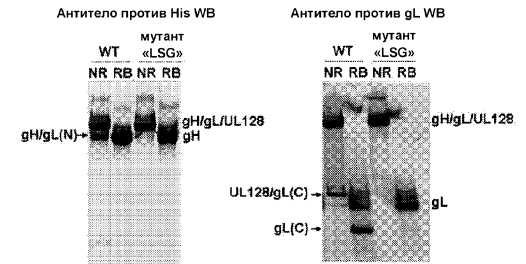
15. Применение иммуногенной композиции по любому из пп.13 и 14 для индуцирования иммунного ответа против цитомегаловируса.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

