



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111542534 B

(45) 授权公告日 2024. 04. 30

(21) 申请号 201880071629.1

(22) 申请日 2018.10.31

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 111542534 A

(43) 申请公布日 2020.08.14

(30) 优先权数据  
62/580,038 2017.11.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2020.05.06

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2018/058540 2018.10.31

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02019/089817 EN 2019.05.09

(73) 专利权人 斯克利普斯研究院  
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 朱江 何林玲

(74) 专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263  
专利代理师 李献忠 张华

(51) Int.Cl.  
C07K 14/005 (2006.01)  
C12N 7/00 (2006.01)  
A61K 45/06 (2006.01)

(56) 对比文件  
US 2011020378 A1,2011.01.27  
W0 2016205704 A2,2016.12.22  
W0 2016138525 A1,2016.09.01  
Leopold Kong,et al.“Uncleaved  
prefusion-optimized gp140 trimers derived  
from analysis of HIV-1 envelope  
metastability”.《Nature Communications》  
.2016,第7卷第2页.

审查员 杨卓一

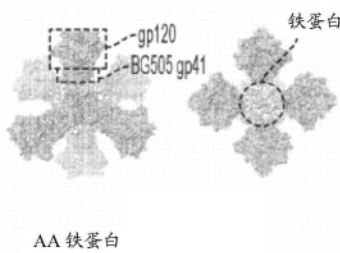
权利要求书2页 说明书25页  
序列表16页 附图16页

(54) 发明名称

新型支架式HIV-1疫苗免疫原

(57) 摘要

本发明提供了新型支架式HIV-1疫苗免疫原。一些支架式免疫原包含与纳米颗粒亚基的N-末端连接的可溶性gp140三聚体和通过短肽间隔子融合至纳米颗粒亚基的C-末端的T辅助表位。本发明的其他一些免疫原包含可溶性gp140三聚体蛋白,其通过作为T-辅助表位的短肽间隔物与稳定的纳米颗粒连接。一些支架免疫原含有存在于由I3-01蛋白、E2p或1VLW蛋白变体形成的纳米颗粒平台上的gp140三聚体免疫原。本发明中还提供了编码本文所述的各种疫苗免疫原的核酸,以及携带所述核酸的表达载体和宿主细胞。本发明还提供了使用支架式HIV-1疫苗免疫原预防或治疗HIV感染的方法。



1. 一种HIV-1疫苗免疫原,其包含存在于自组装纳米颗粒上的HIV-1Env衍生的三聚体蛋白,其中所述自组装纳米颗粒的亚基包含如SEQ ID NO:16所示的多肽;并且其中接头序列(a)融合至所述纳米颗粒亚基的C-末端,而所述HIV-1三聚体蛋白亚基融合至所述纳米颗粒亚基的N-末端,或(b)所述HIV-1三聚体蛋白连接至所述纳米颗粒亚基的N末端。

2. 根据权利要求1所述的HIV-1疫苗免疫原,其中所述纳米颗粒亚基的所述C-末端经由短肽间隔物融合至所述接头序列的所述N-末端。

3. 根据权利要求1所述的HIV-1疫苗免疫原,其中所述HIV-1三聚体蛋白亚基经由第二短肽间隔物融合至所述纳米颗粒亚基的所述N-末端。

4. 根据权利要求1所述的HIV-1疫苗免疫原,其中所述HIV-1Env衍生的三聚体蛋白是未裂解的融合前优化的gp140三聚体。

5. 根据权利要求4所述的HIV-1疫苗免疫原,其中所述未裂解的融合前优化的gp140三聚体是嵌合三聚体,其包含来自HIV-1毒株BG505的经修饰的gp41<sub>ECTO</sub>结构域。

6. 根据权利要求1所述的HIV-1疫苗免疫原,其中所述接头序列包含T辅助表位序列或甘氨酸-丝氨酸接头或两者。

7. 根据权利要求1所述的HIV-1疫苗免疫原,其中所述接头序列包含如SEQ ID NO:1-3中任一者所示的序列、其保守修饰的变体或基本上相同的序列。

8. 根据权利要求1所述的HIV-1疫苗免疫原,其中所述接头序列包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:19的1至5个串联重复序列。

9. 根据权利要求1所述的HIV-1疫苗免疫原,其中所述接头序列通过短肽间隔物融合至所述纳米颗粒亚基的所述C-末端,并且第二短肽间隔物将所述HIV-1三聚体蛋白亚基与所述纳米颗粒亚基的所述N-末端连接。

10. 一种分离的或重组的多核苷酸,其编码根据权利要求1所述的HIV-1疫苗免疫原。

11. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1所述的HIV-1疫苗免疫原和药学上可接受的载体。

12. 根据权利要求11所述的药物组合物,其还包含佐剂。

13. 根据权利要求1所述的HIV-1疫苗免疫原在制备用于预防受试者的HIV-1感染的药物中的用途。

14. 根据权利要求13所述的用途,其中HIV-1疫苗免疫原包含未裂解的融合前优化的gp140三聚体、由如SEQ ID NO 16所示的亚基序列产生的自组装纳米颗粒以及包含如SEQ ID NO:1所示的所述序列的T-辅助表位序列,其中所述T辅助表位序列通过短肽间隔物融合至所述纳米颗粒亚基的所述C-末端,而所述未裂解的融合前优化的gp140三聚体亚基融合至所述纳米颗粒亚基的N-末端。

15. 根据权利要求13所述的用途,其中,融合至所述纳米颗粒亚基的所述C-末端的所述T-辅助表位序列在所述纳米颗粒自组装时被包封在所述纳米颗粒内。

16. 包含治疗有效量的根据权利要求1所述的HIV-1疫苗免疫原的药物组合物在制备用于治疗受试者的HIV-1感染或引发所述受试者的针对HIV-1的免疫应答的药物中的用途。

17. 根据权利要求16所述的用途,其中HIV-1疫苗免疫原包含未裂解的融合前优化的gp140三聚体、由如SEQ ID NO:16所示的亚基序列产生的自组装纳米颗粒以及包含如SEQ ID NO:1所示的所述序列的T-辅助表位序列,其中所述T辅助表位序列通过短肽间隔物融合

至所述纳米颗粒亚基的所述C-末端,而所述未裂解的融合前优化的gp140三聚体亚基融合至所述纳米颗粒亚基的所述N-末端。

18.根据权利要求17所述的用途,其中融合至与所述纳米颗粒亚基的所述C-末端的所述T-辅助表位序列在所述纳米颗粒自组装时被包封在所述纳米颗粒内。

## 新型支架式HIV-1疫苗免疫原

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求美国临时专利申请号62/580,038(2017年11月1日提交;正在审理中)的优先权利益。该优先权申请的全部公开内容通过引用整体并入本文并且用于所有目的。

[0003] 政府支持声明

[0004] 本发明是利用美国国立卫生研究院资助的授权号AI129698、AI125078和AI124337以及美国能源部资助的授权号DE-AC02-76F00515下的政府支持完成的。政府拥有本发明的某些权利。

### 背景技术

[0005] 1型人类免疫缺陷病毒(HIV-1)是获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的主要原因。其可以分为几个不同的进化枝,例如A、B、C、D、E、F、G、H、J和K,它们在世界各地的流程度是不相同的。每个进化枝包含不同的HIV-1毒株,这些毒株已根据其遗传相似性分组在一起。HIV-1的包膜糖蛋白(Env)带有广泛中和抗体(bNAbs)的表位,并且是疫苗设计的唯一目标。裂解的成熟Env作为异二聚体的亚稳三聚体存在于HIV-1病毒粒子表面,每个异二聚体均包含(共)受体结合蛋白gp120和跨膜蛋白gp41,其将三聚体刺突锚定在病毒膜中并驱动细胞融合过程。由于表面聚糖的不稳定性质和致密层,Env长期无法确定结构并阻碍了基于三聚体的疫苗工作。

[0006] 由于利用BG505 SOSIP.664三聚体取得了合乎期望的成功,最近已将类似天然的Env三聚体视为理想的疫苗平台。除了SOSIP之外,还提出了其他三聚体设计平台,例如单链gp140(sc-gp140)三聚体、天然柔性连接(NFL)三聚体和未裂解的融合前优化(UFO)三聚体,从而生产出类似天然的Env三聚体。然而,gp140三聚体可能不是HIV-1疫苗的最佳形式,因为亚单位疫苗的免疫原性通常不如病毒样颗粒(VLP),VLP在颗粒表面上呈递密集的抗原阵列,并诱导疫苗接种后的有效的、持久的免疫应答。

[0007] 尽管越来越多地认识到VLP疫苗在bNAbs诱导中的优势,但是在HIV-1疫苗开发中尚未严格探索使用纳米颗粒作为展示类似天然三聚体的载体。对于安全和有效的HIV-1疫苗,医疗需求仍未得到满足。本发明解决了本领域中的这一需求和其他需求。

### 发明内容

[0008] 在一方面,本发明提供了HIV-1疫苗免疫原。本发明的新型HIV-1疫苗免疫原包含存在于自组装纳米颗粒上的HIV-1 Env衍生的三聚体蛋白并且还包含T辅助表位序列。在一些实施方案中,T辅助表位将HIV-1三聚体蛋白亚基的C-末端连接至纳米颗粒亚基的N-末端。在一些其他实施方案中,将T辅助表位序列融合至纳米颗粒亚基的C-末端,同时将HIV-1三聚体蛋白的C-末端融合至纳米颗粒亚基的N-末端。在后面实施方案的一些中,短肽间隔物用于将T辅助表位融合至纳米颗粒亚基。这使得能在纳米颗粒内部形成疏水核,其起到稳定纳米颗粒结构并促进T细胞对融合免疫原的识别的作用。在这些实施方案中的一些中,所

采用的短肽间隔物可以是例如GGGGS (SEQ ID NO:4) 或GSGSG (SEQ ID NO:19) 的1-5个串联重复序列,或本质上在结构上具有柔性的任何其他肽序列。在这些实施方案中的一些中,另外的短肽区段或间隔物可用于将HIV-1蛋白融合至纳米颗粒亚基的N-末端,例如1G接头或本文所述的任何其他短肽间隔物。在一些实施方案中,T辅助表位序列包含如SEQ ID NO:1-3中任一者所示的氨基酸序列、其保守修饰的变体或基本上相同的序列。

[0009] 通常,HIV-1疫苗免疫原中的自组装纳米颗粒由三聚体蛋白序列产生。在一些实施方案中,自组装纳米颗粒的亚基是(1)如SEQ ID NO:18所示的多肽、其保守修饰的变体或基本上相同的序列,(2)SEQ ID NO:5-17中任一者所示的多肽、其保守修饰的变体或基本上相同的序列,(3)E2p或(4)铁蛋白。

[0010] 在多种实施方案中,本发明的疫苗免疫原中HIV-1 Env衍生的三聚体蛋白是gp140三聚体。在一些实施方案中,所采用的HIV-1 Env衍生的三聚体蛋白是未裂解的融合前优化的(UF0) gp140三聚体。在这些实施方案中的一些中,UFO gp140三聚体是包含来自HIV-1毒株BG505的经修饰的gp41<sub>ECTO</sub>结构域的嵌合三聚体。本发明的一些HIV-1疫苗免疫原包含属于UF0 gp140三聚体的HIV-1 Env衍生的三聚体、由如SEQ ID NOs:5-18中任一者所示的亚基序列产生的自组装纳米颗粒以及包含如SEQ ID NO:1所示序列的T辅助表位。

[0011] 在另一方面,本发明提供了HIV-1疫苗免疫原,其包含存在于自组装纳米颗粒上的HIV-1 Env衍生的三聚体蛋白,所述自组装纳米颗粒由如SEQ ID NOs:5-18中任一者所示的亚单位多肽、其保守修饰的变体或其基本上相同的序列形成。在一些实施方案中,所采用的HIV-1 Env衍生的三聚体蛋白是未裂解的融合前优化的(UF0) gp140三聚体。在这些实施方案中的一些中,UFO gp140三聚体是嵌合三聚体,其包含来自HIV-1毒株BG505的经修饰的gp41<sub>ECTO</sub>结构域。在一些实施方案中,HIV-1疫苗免疫原中的HIV-1三聚体蛋白通过接头序列在其C-末端与纳米颗粒的N-末端连接。在一些其他实施方案中,接头序列通过短肽间隔物融合至纳米颗粒亚基的C-末端,以在纳米颗粒内部形成疏水核,同时UFO gp140三聚体亚基融合至纳米颗粒亚基的N-末端。这起到稳定纳米颗粒结构和促进T细胞对三聚体免疫原的识别的作用。在这些实施方案中的一些中,所采用的短肽间隔物可以是例如GGGGS (SEQ ID NO:4)、GSGSG (SEQ ID NO:19) 或本质上在结构上具有柔性的任何其他肽。在多种实施方案中,所采用的接头序列包含T-辅助表位序列或甘氨酸-丝氨酸接头。在一些实施方案中,接头序列包含如SEQ ID NO:1-3中任一者所示的肽序列、其保守修饰的变体或基本上相同的序列。在一些实施方案中,接头序列包含GGGGS (SEQ ID NO:4) 或GSGSG (SEQ ID NO:19) 的1至5个串联重复序列(例如1或2个重复序列)。在一些实施方案中,另外的短肽间隔物或区段可用于将HIV-1蛋白融合至如本文所例示的纳米颗粒亚基的N-末端。

[0012] 在相关方面,本发明提供了药物组合物,其包含本文所述的新型支架式HIV-1疫苗免疫原中的一种。药物组合物通常还包含药学上可接受的载体。在一些实施方案中,药物组合物还包含佐剂。在另一个相关方面,本发明提供了编码本文所述的HIV-1疫苗免疫原的分离的或重组的多核苷酸、具有此类多核苷酸序列的克隆和表达载体以及内部已引入或整合核酸或载体的宿主细胞。

[0013] 在另一方面,本发明提供了用于预防受试者的HIV-1感染或引发受试者的针对HIV-1的免疫应答的方法。这些方法需要向受试者施用治疗有效量的本文所述的新型支架式HIV-1疫苗免疫原中的一种。通常,HIV-1疫苗免疫原通过药物组合物施用于受试者。在一

些实施方案中,所施用的HIV-1疫苗免疫原包含UF0 gp140三聚体、由如SEQ ID NO:18所示的亚基序列产生的自组装纳米颗粒和如SEQ ID NO:1所示的T-辅助表位序列。在这些实施方案中,T辅助表位序列起到将UF0 gp140三聚体在其C-末端与纳米颗粒亚基的N-末端共价连接的作用。替代地,将T辅助表位序列通过短肽间隔物融合至纳米颗粒亚基的C-末端,同时将UF0 gp140三聚体亚基融合至纳米颗粒亚基的N-末端。

[0014] 在另一方面,本发明提供了治疗受试者的HIV-1感染或引发受试者的针对HIV-1的免疫应答的方法。所述方法包括向受试者施用包含治疗有效量的本文所述的HIV-1疫苗免疫原的药物组合物。在一些实施方案中,所施用的HIV-1疫苗免疫原包含UF0 gp140三聚体、由如SEQ ID NO:18所示的亚基序列产生的自组装纳米颗粒和如SEQ ID NO:1所示的T-辅助表位序列。在这些方法中,T辅助抗原表位序列起到将UF0 gp140三聚体在其C-末端与纳米颗粒亚基的N-末端共价连接的作用。替代地,将T辅助表位序列通过短肽间隔物融合至纳米颗粒亚基的C-末端,同时将UF0 gp140三聚体亚基融合至纳米颗粒亚基的N-末端。

[0015] 通过参考说明书和权利要求的其余部分,可以实现对本发明的本质和优点的进一步的理解。

## 附图说明

[0016] 图1显示了呈递不同的UF0<sup>2</sup>-BG三聚体的铁蛋白纳米颗粒和具有嵌入的T-辅助信号的基于I3-01的gp140纳米颗粒。(A) UF0<sup>2</sup>-BG gp140-铁蛋白(FR)纳米颗粒的表面模型,其具有gp120、UF0设计的BG505 gp41<sub>ECTO</sub>和在gp140-FR图像上用虚线圈出并用箭头标记的铁蛋白。(B) 在单步2G12抗体亲和纯化之后,八个UF0<sup>2</sup>-BG-FR纳米颗粒的BN-PAGE。(C) 源自五个代表性的UF0<sup>2</sup>-BG-FR纳米颗粒的负染色EM的无参考2D平均值。(D) 五个代表性的UF0<sup>2</sup>-BG-FR纳米颗粒对一小组由六个bNAbs和四个非NAbs组成的抗原图谱。使用六种浓度的抗原滴定系列(以两倍的稀释度,从35nM开始)从Octet RED96获得传感图。矩阵中汇总了最高浓度的峰值,其中上小组和下小组分别显示了六个bNAbs和四个非NAbs。较高的灰色阴影强度表示通过Octet测得的较大结合信号。(E) 左侧显示I3-01纳米颗粒的表面模型(浅灰色),围绕着正面5倍轴的亚基以深灰色突出显示,形成3倍轴的三个亚基用黑色虚线三角形标记。中间显示了:围绕3倍轴的三个I3-01个亚基的N-末端之间的间隔(顶视图)和gp140三聚体通过柔性接头(由黑色虚线表示)在三个I3-01个亚基上的锚定。右侧显示了同时包含gp140和T辅助表位的I3-01纳米颗粒构建体的示意图,其中列出了三个这样的T辅助表位PADRE、D和TpD的序列(分别为SEQ ID NO:1-3)。(F) 三个I3-01纳米颗粒的SEC图谱,所述I3-01纳米颗粒呈递HR 1重新设计的BG505 gp140三聚体,其中不同的T辅助表位作为接头。(G) 单步2G12亲和力抗体纯化后的三个上述I3-01纳米颗粒的BN-PAGE。(H) 源自I3-01纳米颗粒的负染色EM的无参考2D类平均值,其呈递HR1重新设计的BG505 gp140三聚体,其中PADRE用作接头。(I) gp140-PADRE-I3-01纳米颗粒针对具有六个bNAbs和四个非NAbs的小组的抗原图谱。使用6种浓度(以两倍稀释,从14nM开始)的抗原滴定序列从Octet RED96获得传感图。在右边的PGT151结合图谱旁边标出了六种抗原浓度,分别对应于10个抗体图谱中每一个的从上到下的六根线。

[0017] 图2显示了通过三聚体呈递的纳米颗粒而实现的有效B细胞活化。携带(A) PGT145、(B) PGT121和(C) VRC01受体的B细胞转染子中的Ca<sup>2+</sup>动员。用抗BCR抗体或所示抗原

以 $10\mu\text{g ml}^{-1}$ 的浓度刺激表达强力霉素诱导形式的bNAb B细胞受体(BCR)的WEHI231细胞:抗人Ig $\kappa$ 链F(ab')<sub>2</sub>;抗小鼠IgM;衍生自进化枝-A、B、C、B/C或A/E毒株的UF0<sup>2</sup>-BG-FR纳米颗粒,或在gp41<sub>ECTO</sub>内包含重新设计的HR1弯曲的BG505 gp140-PADRE-I3-01纳米颗粒。

[0018] 图3显示了小鼠免疫中对三聚体和纳米颗粒的早期中和抗体应答。(A)左侧为小鼠免疫方案的示意图,中间列出了配方和免疫的关键参数,并且右侧为血清IgG纯化方案。(B)测试基于BG505三聚体的免疫原和纯化的小鼠血清IgG与三种HIV-1抗原的ELISA结合,三种HIV-1抗原包括BG505 UF0三聚体、呈递N332支架(1GUT\_A\_ES-FR)的铁蛋白纳米颗粒或呈递另一N332支架(1KIG\_L\_ES-2-I3-01)的I3-01纳米颗粒以及进化枝-C V1V2-铁蛋白纳米颗粒(V1V2-FR)。除最大OD<sub>450</sub>值低于0.1的情况或数据拟合不明确的情况外,所有ELISA图均标有EC<sub>50</sub>值。(C)HIV-1被纯化的小鼠血清IgG中和,IC<sub>50</sub>值以灰色阴影显示。灰色阴影强度越高,表示中和作用越强。(D)来自支架式三聚体组(S1G5)的小鼠血清IgG的组合组的中和图谱。(E)来自铁蛋白纳米颗粒组(S2G1)的小鼠血清IgG和小鼠-A血清IgG的组合组的中和图谱。(F)来自I3-01纳米颗粒组(S2G5)的小鼠血清IgG、小鼠A和小鼠D血清IgG的组合组的中和图谱。用被包含的MLV测试了两种HIV-1伪病毒、进化枝-A tier-2 BG505和进化枝-B tier-1 SF162,以进行比较。紧邻小鼠血清IgG的组合组的中和图谱显示了支架式gp140三聚体、铁蛋白纳米颗粒和I3-01纳米颗粒的结构模型。

[0019] 图4显示了具有T辅助表位的HIV-1 gp140三聚体呈递纳米颗粒的设计构思、SEC图谱和负染色EM图像,其中T辅助表位融合到纳米颗粒亚基的C-末端。(A)E2p和I3-01纳米颗粒设计的示意图,其中泛反应性(pan-reactive)T辅助表位融合到纳米颗粒亚基的C-末端。(B)使用2G12抗体亲和柱纯化后从Superose 6 10/300 GL柱获得的BG505 gp140三聚体-呈递E2p和I3-01纳米颗粒的SEC图谱。(C)从负染色EM获得的BG505 gp140三聚体-呈递的E2p和I3-01纳米颗粒的原始显微照片。

## 具体实施方式

### [0020] I. 概述

[0021] 本发明部分基于本发明人对新型HIV-1 gp140纳米颗粒免疫原的开发。如本文的实施例中详述的,发明人利用了T辅助表位,其不仅充当gp140和展示(display)纳米颗粒支架之间的接头,而且还充当嵌入的T辅助信号以诱导稳健的T细胞应答并操纵B细胞向bNAb的发展。发明人还探索了先前未利用的蛋白(1VLW),以在呈递HIV-1 gp140三聚体中提供稳定的纳米颗粒支架。在用亲和柱和尺寸排阻色谱法纯化后,各种支架式HIV-1 gp140免疫原显示出优异的纯度和均质性。当用bNAb和非NAb评估时,本文所述的新型HIV-1 gp140纳米颗粒显示出具有强PG16结合的突出的抗原谱,而其他已知的HIV-1 gp140纳米颗粒未观察到。进一步举例而言,通过对小鼠进行免疫处理并评估分离自小鼠的IgG的HIV-1中和活性来检查展示BG505 gp140三聚体的纳米颗粒的免疫原性。对于本文公开的两种HIV-1 gp140纳米颗粒(S2G5和S2G6)以及对照HIV-1免疫原(支架式gp140.681三聚体(S1G5)和铁蛋白纳米颗粒(S2G1),观察到自体tier-2 BG505.N332 HIV-1病毒的中和。重要的是,本文所述的新型HIV-1 gp140纳米颗粒免疫原产生的IC<sub>50</sub>值表明仅在免疫8周后即可产生tier-2 NAb的快速发展,从而提供迄今为止鉴定出的最佳HIV-1疫苗候选物,其中T-和B-细胞反应平衡。

[0022] 因此,本发明提供了具有如本文所例示的T辅助表位的新型支架式HIV-1疫苗免疫原。本发明中还提供了包含由1VLW变体形成的稳定的纳米颗粒的支架式HIV-1疫苗免疫原。本发明另外提供了这些新型支架式HIV-1免疫原在治疗或预防HIV-1感染中的治疗和预防应用。

[0023] 除非本文另有说明,否则本发明的疫苗免疫原、编码的多核苷酸、表达载体和宿主细胞以及相关的治疗应用都可以根据本文例示的方法或在本技术领域中公知的常规实践的方法产生或进行。参见例如Methods in Enzymology,Volume 289:Solid-Phase Peptide Synthesis,J.N.Abelson,M.I.Simon,G.B.Fields(编辑),Academic Press;第1版(1997)(ISBN-13:978-0121821906);美国专利No.4,965,343和No.5,849,954;Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,N.Y.,(第3版,2000);Brent等人,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,Inc.(ringbrou编辑,2003);Davis等人,Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier Science Publishing,Inc.,New York,USA(1986);或者Methods in Enzymology:Guide to Molecular Cloning Techniques,第152卷,S.L.Berger和A.R.Kimmerl编辑,Academic Press Inc.,San Diego,USA(1987);Current Protocols in Protein Science(CPPS)(John E.Coligan等人编辑,John Wiley and Sons,Inc.),Current Protocols in Cell Biology(CPCB)(Juan S.Bonifacino等人编辑,John Wiley and Sons,Inc.),以及Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique by R.Ian Freshney,Publisher:Wiley-Liss;第5版(2005),Animal Cell Culture Methods(Methods in Cell Biology,第57卷,Jennie P.Mather和David Barnes编辑,Academic Press,第1版,1998)。以下各部分为实施本发明的组合物和方法提供了额外的指导。

## [0024] II.定义

[0025] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的含义相同含义。以下的参考文献为技术人员提供了本发明中使用的许多术语的一般定义:Academic Press Dictionary of Science and Technology,Morris(编辑),Academic Press(第1版,1992);Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology,Smith等人(编辑),Oxford University Press(修改版,2000);Encyclopaedic Dictionary of Chemistry,Kumar(编辑),Anmol Publications Pvt.Ltd.(2002);Dictionary of Microbiology and Molecular Biology,Singleton等人(编辑),John Wiley&Sons(第3版,2002);Dictionary of Chemistry,Hunt(编辑),Routledge(第1版,1999);Dictionary of Pharmaceutical Medicine,Nahler(编辑),Springer-Verlag Telos(1994);Dictionary of Organic Chemistry,Kumar和Anandand(编辑),Anmol Publications Pvt.Ltd.(2002);以及A Dictionary of Biology(Oxford Paperback Reference),Martin和Hine(编辑),Oxford University Press(第4版,2000)。本文提供了这些术语中的某些术语在其专门适用于本发明时的进一步说明。

[0026] 如本文所使用的,单数形式的“一”、“一个”和“该”既指单数也指复数,除非上下文另外明确指出。例如,“一个Env衍生的三聚体”可以指单个Env衍生的三聚体分子或多个Env衍生的三聚体分子两者,并且可以被认为等同于短语“至少一个Env衍生的三聚体”。

[0027] 除非另有说明,否则术语“抗原”和“免疫原”可互换使用,是指能够在受试者中诱



导免疫应答的物质,通常是蛋白。该术语还指的是具有免疫活性的蛋白,意指其一旦施用给受试者(直接施用或通过向受试者施用编码该蛋白的核苷酸序列或载体)就能够引起针对该蛋白的体液和/或细胞类型的免疫应答。因此,在一些实施方案中,术语“免疫原”可以广泛地涵盖编码本文所述的多肽或蛋白抗原的多核苷酸。

[0028] 术语“保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列两者。关于特定的核酸序列,保守修饰的变体是指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的核酸,或在核酸不编码氨基酸序列的核酸的情况下,是指基本上相同的序列。由于遗传密码的简并性,因此大量功能相同的核酸编码任何给定的蛋白。对于多肽序列,“保守修饰的变体”是指具有保守氨基酸取代(即被具有侧链的带有相似电荷的其他氨基酸残基取代的氨基酸残基)的变体。具有侧链的带有相似电荷的氨基酸残基的家族已经在本技术领域定义。这些家族包括:具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)、具有 $\beta$ -支链侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0029] 表位是指抗原决定簇。这些是分子上的具有抗原性的特定化学基团或肽序列,使得它们引起特异性的免疫应答,例如,表位是抗原的让B和/或T细胞响应的区域。表位可以由通过蛋白的三级折叠并置的连续氨基酸或不连续氨基酸形成。

[0030] 有效量的疫苗或其他试剂,其足以产生所需的应答,例如减轻或消除病症或疾病(例如AIDS)的体征或症状。例如,这可以是抑制病毒复制或可测量地改变病毒感染的外在症状(例如在HIV-1感染的情况下T细胞计数增加)所需的量。通常,该量将足以可测量地抑制病毒(例如,HIV)的复制或传染性。当施用于受试者时,通常将使用将达到目标组织浓度(例如,在淋巴细胞中)的剂量,该剂量已显示实现体外抑制病毒复制。在一些示例中,“有效量”是治疗(包括预防)任何一种病症或疾病的一种或多种症状和/或潜在原因(例如用以治疗HIV)的量。在一示例中,有效量是治疗有效量。在一个示例中,有效量是防止特定疾病或病症的一种或多种体征或症状(例如与AIDS相关的一种或多种体征或症状)发展的量。

[0031] 铁蛋白是在所有动物、细菌和植物中发现的球状蛋白。它的主要作用是通过水合铁离子和质子进出矿化芯的运输来控制多核 $\text{Fe(III)}_2\text{O}_3$ 的形成速率和位置。铁蛋白的球状形式由单体亚基蛋白(也称为单体铁蛋白亚基)组成,它们是分子量为约17-20kDa的多肽。

[0032] 如本文所用的,融合蛋白是含有来自至少两个不相关蛋白的氨基酸序列的重组蛋白,所述至少两个不相关蛋白已经通过肽键连接在一起以形成单个蛋白。不相关的氨基酸序列可以彼此直接连接,或者可以使用接头序列连接。如本文所用的,如果蛋白的氨基酸序列通常在其天然环境(例如,细胞内)中未通过肽键连接在一起,则这些蛋白是不相关的。例如,通常组成铁蛋白的单体亚基的氨基酸序列和HIV-1 gp120或gp41糖蛋白的氨基酸序列通常没有通过肽键连接在一起。

[0033] HIV-1包膜蛋白(Env)最初被合成为大小为845-870个氨基酸的更长的前体蛋白,其称为gp160。gp160形成同型三聚体,并在高尔基体(Golgi apparatus)中发生糖基化。在体内,将gp160糖蛋白通过内蛋白水解方式加工成成熟的包膜糖蛋白gp120和gp41,它们在病毒表面的复合物中彼此非共价结合。gp120表面蛋白包含人类CD4(HIV的主要受体)的高

亲和力结合位点,以及与融合共受体相互作用的区域,例如趋化因子受体CCR5和CXCR4。gp41蛋白横跨病毒膜,并在其氨基末端含有对病毒膜和细胞膜融合重要的氨基酸序列。具有融合能力的天然形式的HIV-1包膜糖蛋白复合物是由三个gp120和三个gp41亚基组成的三聚体结构。受体结合(CD4和共受体)位点位于gp120部分,而融合肽位于gp41部分。野生型gp160多肽的示例性序列显示在GenBank中,例如,登录号为AAB05604和AAD12142。

[0034] gp140是HIV包膜蛋白的寡聚形式,其包含所有gp120和整个gp41胞外域。如本文所用的,HIV-1 gp140三聚体免疫原通常包含gp140结构域和gp140的经修饰或重新设计的胞外域(gp41<sub>ECTO</sub>)。

[0035] gp120是人免疫缺陷病毒(HIV)的包膜蛋白。gp120包含HIV包膜糖蛋白复合物的大多数外部表面暴露域,并且gp120与细胞CD4受体和细胞趋化因子受体(例如CCR5)结合。成熟的gp120野生型多肽在主序列中具有约500个氨基酸。Gp120被严重N-糖基化,从而产生120kD的表观分子量。该多肽由五个保守区(C1-05)和五个高变异性区(V1-V5)组成。在其三级结构中,gp120糖蛋白由三个主要结构域(外部结构域、内部结构域和桥接片)以及可变环组成。参见,例如,Wyatt等人,Nature 393,705-711,1998;以及Kwong等人,Nature 393,649-59,1998。据信内部结构域与gp41包膜糖蛋白相互作用,而外部结构域暴露在组装的包膜糖蛋白三聚体上。

[0036] gp120的可变区1和可变区2(V1/V2结构域)包含约50-90个残基,所述残基含有HIV-1的两个最具可变性的部分(V1环和V2环),并且V1/V2结构域的十个残基中的一个被N-糖基化。

[0037] gp41是前体HIV包膜蛋白的蛋白水解产物。其包含N-末端融合肽(FP)、跨膜结构域以及将融合肽和跨膜结构域连接起来的胞外域。gp41保持三聚体构型,并以非共价方式与gp120相互作用。示例性gp41的氨基酸序列在GenBank中以登录号CAD20975列出。

[0038] BG505 SOSIP.664 gp140是用进化枝-A毒株BG505的gp140三聚体开发的HIV-1 Env免疫原。它在裂解的gp120和gp41<sub>ECTO</sub>之间包含带有工程化二硫键(称为SOS)的共价键。此外,它还具有I559P突变(称为IP),以使gp41融合后构象不稳定,并在残基664处截短膜近端外部区域(MPER),以提高溶解度。这种HIV-1免疫原具有出色的抗原谱和天然刺突的出色结构模拟。使用SOSIP三聚体作为分选探针,已经鉴定并表征了新的bNAbs。SOSIP设计也已扩展到其他HIV-1毒株,并允许并入其他稳定突变。最近,已报道了兔和非人类灵长类动物中SOSIP三聚体的免疫原性,其为人类疫苗试验铺平了道路。

[0039] 免疫应答是指免疫系统的细胞(例如B细胞、T细胞或单核细胞)对刺激的应答。在一些实施方案中,该应答对特定抗原是特异性的(“抗原特异性应答”)。在一些实施方案中,免疫应答是T细胞应答,例如CD4+应答或CD8+应答。在一些其他实施方案中,该反应是B细胞反应,并导致特异性抗体的产生。

[0040] 免疫原性组合物是指包含免疫原性多肽的组合物,所述免疫原性多肽诱导针对表达免疫原性多肽的病毒的可测量的CTL应答,或诱导针对免疫原性多肽的可测量的B细胞应答(例如抗体的产生)。

[0041] 两个或更多个核酸序列或两个或更多个氨基酸序列之间的序列同一性或相似性以这些序列之间的同一性或相似性表示。序列同一性可以用百分比同一性来衡量;百分比越高,序列越相同。当针对在比较窗口或选定区域上的最大对应性进行比较和比对时,如果

两个序列具有指定百分比的相同的氨基酸残基或核苷酸(即在指定区域上或未指定时在整个序列上具有60%同一性,任选地具有65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%的同一性),所述比较窗口或选定区域使用以下序列比较算法之一或者通过手动比对和目视检查来测定。任选地,同一性存在于长度至少约50个核苷酸(或10个氨基酸)的区域上,或更优选地存在于长度为100至500或1000或更多个核苷酸(或20、50、200或更多个氨基酸)的区域上。

[0042] 当使用标准方法比对时,核酸或氨基酸序列的同系物或直系同源物具有相对较高的序列同一性/相似性程度。用于比较的序列比对方法是本领域公知的。下述文献描述了各种程序和比对算法:Smith和Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman&Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson和Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988; Higgins&Sharp, *Gene*, 73:237-44, 1988; Higgins和Sharp, *CABIOS* 5:151-3, 1989; Corpet等人, *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90, 1988; Huang等人, *Computer Appls. in the Biosciences* 8, 155-65, 1992; 以及Pearson等人, *Meth. Mol. Bio.* 24:307-31, 1994. Altschul等人, *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990提供了对序列比对方法和同源性计算的详细介绍。

[0043] 术语“受试者”是指被分类为哺乳动物的任何动物,例如人类和非人类哺乳动物。非人类动物的示例包括狗、猫、牛、马、绵羊、猪、山羊、兔子等。除非另有说明,否则术语“患者”或“受试者”在本文中可互换使用。优选地,受试者是人类。

[0044] 术语“治疗”或“减轻”包括向受试者施用化合物或药剂以预防或延缓疾病(例如, HIV感染)的症状、并发症或生化指标的发作,减轻症状或者阻止或抑制疾病、病症或障碍的进一步发展。需要治疗的受试者包括已经患有该疾病或病症的那些以及有患该病症的风险的那些。治疗可以是预防性的(预防或延缓疾病的发作,或预防其临床或亚临床症状的表现),或者疾病表现后的治疗性抑制或症状缓解。

[0045] 未裂解的融合前优化的(UF0)三聚体是指与gp120蛋白和重新设计的gp41<sub>ECT0</sub>结构域形成的HIV-1 gp140三聚体蛋白,其导致更稳定的HIV-1 gp140三聚体。重新设计的gp41<sub>ECT0</sub>结构域基于原型HIV-1毒株BG505(以及原型gp140三聚体BG505 SOSIP.664 gp140),并且相对于野生型BG505 gp41<sub>ECT0</sub>序列包含一个或多个修饰。这些修饰包括(1)用较短的环序列替换HR1的21个残基N-末端(残基548-568)以稳定融合前gp140结构和(2)替换gp120和gp41之间的弗林蛋白酶(furin)裂解位点(残基508-511)具有柔性接头序列,例如GGGGS(SEQ ID NO:4)基序的串联重复序列。在一些实施方案中,UFO三聚体可另外包含在gp120和gp41之间的工程化的二硫键和/或gp41中的稳定突变。例如,基于HIV-1毒株BG505的UF0三聚体可包含在残基A501C和T605C之间的工程化的二硫键和/或稳定突变I559P。UF0三聚体的详细描述在例如Kong等人, *Nat. Comm.* 7:12040, 2016中提供。除了基于BG505毒株序列的UF0三聚体外,工程化的gp41<sub>ECT0</sub>结构域还可与来自许多不同HIV-1毒株或亚型的gp120多肽配对,以形成“嵌合”gp140三聚体。这样的嵌合三聚体被称为“UF0-BG”或“UF0<sup>2</sup>-BG”,如本文例示的。

[0046] 疫苗是指在受试者中引起预防性或治疗性免疫应答的药物组合物。在一些情况下,免疫应答是保护性免疫应答。通常,疫苗引起针对病原体(例如病毒病原体)的抗原或在与病理状况相关的细胞成分的抗原特异性免疫应答。疫苗可以包括多核苷酸(例如编码公开的抗原的核酸)、肽或多肽(例如公开的抗原)、病毒、细胞或一种或多种细胞成分。

[0047] 病毒样颗粒 (VLP) 是指非复制的病毒壳,其衍生自多种病毒中的任何一种。VLP通常由一种或多种病毒蛋白组成,例如但不限于被称为衣壳蛋白、外壳蛋白、壳蛋白、表面蛋白和/或包膜蛋白的那些蛋白,或衍生自这些蛋白的形成颗粒的多肽。在适当的表达系统中重组表达蛋白时,VLP可以自发形成。产生特定VLP的方法是本领域已知的。重组表达病毒蛋白后VLP的存在可以使用本领域已知的常规技术来检测,例如通过电子显微镜、生物物理表征等来检测。参见,例如,Baker等人,(1991)Biophys.J.60:1445-1456;以及Hagensee等人,(1994)J.Virol.68:4503-4505。例如,VLP可以通过密度梯度离心分离和/或通过特征密度带鉴定。替代地,可以对所讨论的VLP制剂的玻璃化含水样品进行冷冻电子显微镜检查,并在适当的曝光条件下记录图像。

### [0048] III. 新型支架式HIV-1三聚体免疫原

[0049] 本发明提供了HIV-1免疫原,其包含呈现或掺入三聚HIV-1Env衍生的蛋白(例如,gp140三聚体)以及T辅助或接头序列的异源支架。在一些实施方案中,异源呈递支架是自组装纳米颗粒。在一些其他实施方案中,异源呈递支架是病毒样颗粒(VLP),例如噬菌体Q<sub>β</sub> VLP。在一些实施方案中(如本文实施例1中所举例说明的),三聚HIV-1蛋白的亚基通过本文所述的接头序列(例如T-辅助表位多肽,其也起到促进T细胞识别融合免疫原的作用)与展示支架(例如,纳米颗粒)的亚基的N-末端连接。在一些其他实施方案中(如本文实施例7中所举例说明的),HIV-1三聚体蛋白的亚基连接(例如,共价连接)到展示支架的亚基的N-末端,并且T-辅助或接头表位是融合至展示支架(例如,纳米颗粒)的亚基的C-末端。在后面的实施方案中,可以通过短肽间隔物将T辅助表位融合至纳米颗粒亚基。这允许在纳米颗粒内部形成疏水核,其起到稳定纳米颗粒结构并促进T细胞识别融合免疫原的作用。在多种实施方案中,短肽间隔物可以是例如GGGGS(SEQ ID NO:4),GSGSG(SEQ ID NO:19)的1-5个重复序列,或本质上在结构上具有柔性的任何肽。举例而言,可以使用5-aa GGGGS间隔物将T-辅助表位PADRE融合到E2p和I3-01的亚基的C-末端(实施例7)。除了使用短肽间隔物将T辅助表位融合至纳米颗粒亚基的C-末端外,第二个短肽间隔物或片段也可用于将HIV-1三聚体融合至纳米颗粒亚基的N-末端。例如,HIV-1蛋白可以通过例如单个甘氨酸残基(“1G接头”)或在本文例示的10-aa GGGSGGGGS(SEQ ID NO:20)间隔物(实施例7)与展示纳米颗粒亚基的N-末端融合。

[0050] 可以将任何Env衍生的HIV-1三聚体蛋白用于纳米颗粒呈递的疫苗组合物中。Env衍生的三聚体蛋白可获自多种HIV-1毒株。在一些实施方案中,纳米颗粒呈现基于HIV-1 Env的糖蛋白或结构域的天然三聚体形式,例如gp140、gp120或V1V2结构域。在一些实施方案中,Env衍生的三聚体来自HIV-1毒株BG505,例如BG505.SOSIP.664gp140三聚体。在一些实施方案中,纳米颗粒具有经修饰的gp140三聚体免疫原,例如,Kong等人,Nat.Comm.7,12040,2016中描述的HR1-修饰的gp140三聚体(“UF0三聚体”)。在一些实施方案中,本发明中使用的HIV-1三聚体免疫原是如本文例示的UF0<sup>2</sup>-BG三聚体。UF0<sup>2</sup>-BG三聚体是嵌合gp140三聚体,该嵌合gp140三聚体包含(1)具有重新设计的HR1 N-末端弯曲和裂解位点接头的BG505 gp41结构域(如Kong等人,Nat.Comm.7,12040,2016中所述))和(2)来自其他多种HIV-1毒株或亚型之一的gp120蛋白。除了从BG505毒株重新设计的gp41<sub>ECTO</sub>结构域之外,适用于本发明的嵌合gp140三聚体中的gp41结构域也可以是衍生自HIV-1序列数据库的共有(consensus)gp41<sub>ECTO</sub>结构域。

[0051] 在多种实施方案中,可以通过将三聚体免疫原融合到纳米颗粒的亚基(例如I3-01、1VLW衍生的多肽序列或铁蛋白亚基)来构建展示这些HIV-1 Env衍生的免疫原中的任何免疫原的纳米颗粒。这些基于纳米颗粒的HIV-1免疫原的抗原性和结构完整性可通过标准测定法(例如抗体结合测定法和负染色电子显微镜(EM))容易地分析。如本文所举例说明的,各种融合分子都可以全部自组装成纳米颗粒,该纳米颗粒展示出Env衍生的三聚体(例如gp140)的免疫原性表位。通过引发稳健的三聚体特异性bnAb,这些纳米颗粒可用于为个体进行接种以抵抗各种HIV-1病毒。

[0052] 在一些实施方案中,本发明的支架式gp140三聚体免疫原包含T辅助表位,其充当将gp140三聚体连接至纳米颗粒支架的接头。在一些其他实施方案中,T辅助表位通过短肽间隔物融合至纳米颗粒亚基的C-末端,并被包封在纳米颗粒支架内。可以在这些实施方案中使用的短肽间隔物可以是例如GGGS、GSGSG或本质上在结构上具有柔性的任何其他肽。除了其作为支架式免疫原的结构元件的作用外,T辅助表位还提供嵌入的T辅助信号,以诱导稳健的T细胞应答并引导B细胞朝向bnAb发育。本领域已知的任何T辅助表位序列或肽均可用于本发明的实施中。它们包括任何包含MHC II类表位的多肽序列,并且在免疫后可以有效激活辅助T细胞。参见,例如,Alexander等人,Immunity 1,751-761,1994;Ahlers等人,J.Clin.Invest.108:1677-1685,2001;Fraser等人,Vaccine 32,2896-2903,2014;De Groot等人,Immunol.Cell Biol.8:255-269,2002;以及Gene Ther.21:225-232,2014。在一些优选的实施方案中,所采用的T辅助表位是通用泛(pan)DR表位肽(PADRE)。在这些实施方案中的一些中,接头包含序列AKFVAAWTLKAAA(SEQ ID NO:1)、其保守修饰的变体或基本上相同(例如,至少90%、95%或99%相同)的序列。在一些其他实施方案中,所采用的T辅助表位是DT辅助表位QSIALLSSLMVAQAIP(SEQ ID NO:2)或TpD表位ILMQYIKANSKFIGIPMGLPQSIALLSSLMVAQ(SEQ ID NO:3)。在多种实施方案中,接头可包含如SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3所示的序列,基本上相同(例如,至少90%、95%或99%相同)的序列或其保守取代的序列。

[0053] 如上所述,用于呈递或展示三聚HIV-1蛋白的异源支架优选是纳米颗粒。各种纳米颗粒平台可用于产生本发明的疫苗组合物。通常,用于本发明的纳米颗粒需要由单个亚基的多个拷贝形成。附加地或可替代地,颗粒亚基的氨基末端必须暴露并紧邻3倍轴,并且三个氨基末端的间隔必须与各种HIV-1三聚体成分的羧基末端的间隔紧密匹配。在一些优选的实施方案中,免疫原包含具有约20nm或更小的直径的自组装的纳米颗粒(通常由12个,24个或60个亚基(subunits)组装而成)和在颗粒表面上的3倍轴。此类纳米颗粒提供了合适的颗粒平台以生产多价HIV-1三聚体疫苗。

[0054] 在一些实施方案中,本发明的支架式gp140三聚体免疫原用超稳定的纳米颗粒支架构建。例如,可以用Hsia等人,Nature 535,136-139,2016中描述的I3-01蛋白产生自组装纳米颗粒。该蛋白的氨基酸序列以SEQ ID NO:18示出。在一些其他实施方案中,超稳定纳米颗粒支架可以基于如Hsia等人(同上)所述的I3-01的变体,包括保守修饰的变体或具有基本上相同(例如,至少90%、95%或99%相同)的序列的变体。在一些实施方案中,用于将gp140三聚体连接至I3-01衍生的纳米颗粒平台的接头序列包含如上所述的T辅助表位。在一些其他实施方案中,甘氨酸-丝氨酸多肽用作将gp140三聚体连接至I3-01衍生的纳米颗粒平台的第二肽间隔物,并且T辅助表位经由短肽间隔物被融合至纳米颗粒亚基的C-末端。这种结构设计导致在纳米颗粒内部产生疏水核,这增强了T细胞对显示在纳米颗粒表

面的gp140三聚体的识别。在多种实施方案中,用于将T-辅助表位连接至纳米颗粒亚基的C-末端的短肽间隔物可以是例如GGGS、GSGS或本质上在结构上具有柔性的任何其他肽。

[0055] I3-01序列 (SEQ ID NO:18) :

MHHHHHHGSGSGSGSGSMKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKALAVF  
LGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSFLKEMGAIIGAGTVTSVEQCRKAVESGAEFI  
[0056] VSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTLVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQF  
VKAMKGPFPNVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLAVGVGSALVKGTPVEVAE  
KAKAFVEKIRGCTE

[0057] 在一些实施方案中,本发明的支架式gp140三聚体免疫原中的超稳定纳米颗粒是用铁蛋白(一种来自幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 的天然纳米颗粒) 构建的。例如,支架式gp140三聚体免疫原可包含与铁蛋白连接并呈递在铁蛋白上的UF0<sup>2</sup>-BG三聚体。在这些实施方案中的一些中,UF0<sup>2</sup>-BG三聚体直接连接至铁蛋白亚基而没有接头序列,如本文所例示的。在一些其他实施方案中,可以使用接头序列,例如T辅助表位或简单的甘氨酸-丝氨酸接头。在这些实施方案中的一些中,可以通过短肽间隔物将T辅助表位融合至纳米颗粒亚基的C-末端,这导致在纳米颗粒支架内形成疏水核。如本文所述,在这些实施方案中使用的短肽间隔物可以是例如GGGS、GSGS或本质上在结构上具有柔性的任何其他肽。铁蛋白是一种在所有动物、细菌和植物中发现的球状蛋白。球状形式的铁蛋白由单体亚基蛋白(也称为单体铁蛋白亚基)组成,所述单体亚基蛋白是分子量为约17-20kDa的多肽。本发明中使用的单体铁蛋白亚基是铁蛋白蛋白的全长的单个多肽或其能够指导单体铁蛋白亚基的自组装成蛋白的球状形式的任何部分。来自任何已知铁蛋白蛋白的单体铁蛋白亚基的氨基酸序列就可以用于生产本发明的融合蛋白,只要单体铁蛋白亚基能够自组装成纳米颗粒从而在其表面上显示HIV-1表位即可。除了铁蛋白外,本发明还可以采用许多具有相似分子特性的其他自组装纳米颗粒。这些包括,例如,具有以下PDB ID的分子:1JIG(来自炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*) 的12聚体Dlp-2)、1UVH(来自耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium Smegmatis*) 的12聚体DPS)、2YGD(24聚体晶状体伴侣 $\alpha$ B-晶体蛋白)、3CS0(24聚体DegP24)、3MH6和3MH7(24聚体HtrA蛋白酶)、3PV2(12聚体HtrA同源DegQ WT)、4A8C(来自大肠杆菌 (*E. Coli.*) 的12聚体DegQ)、4A9G(来自大肠杆菌 (*E. Coli.*) 的24聚体DegQ)、4EVE(来自幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 菌株YS29的12聚体HP-NAP) 和4GQU(来自结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的24聚体HisB)。

[0058] 在一些实施方案中,本发明的支架式gp140三聚体免疫原可以用衍生自蛋白1VLW (SEQ ID NO:5) 或其如本文中例示的变体 (SEQ ID NO:6-17) 的纳米颗粒支架构建。在多种实施方案中,可以用多肽序列产生用于构建本发明的支架式gp140免疫原的纳米颗粒平台,所述多肽序列是SEQ ID NO:5-18中任何一个的保守修饰的变体或基本上相同的序列。在一些实施方案中,用于将gp140三聚体连接至1VLW衍生的纳米颗粒平台的接头序列包含如上所述的T辅助表位。在一些其他实施方案中,用于将gp140三聚体连接至1VLW衍生的纳米颗粒平台的接头包含简单的肽序列。例如,可以用甘氨酸-丝氨酸接头(例如,包含GGGS (SEQ ID NO:4) 或GSGS (SEQ ID NO:19) 的1至5个重复序列(例如1或2个重复序列的接头) 来构建支架式免疫原。在一些其他实施方案中,可以通过短肽间隔物将T-辅助表位融合至纳米颗

粒亚基的C-末端以在纳米颗粒内部形成疏水核。在多种实施方案中,所采用的短肽间隔物可以是例如GGGS、GSGSG或本质上在结构上具有柔性的任何其他肽。

[0059] 在一些其他实施方案中,用于呈递HIV-1三聚体免疫原的纳米支架是来自嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)的二氢脂酰基转移酶(E2p)的重新设计的变体。E2p是直径为23.2nm并且具有12个大开口的60聚体热稳定纳米颗粒,该12个大开口将颗粒表面上的三倍顶点间隔开。与野生型E2p纳米颗粒相比,用于构建本发明的支架式HIV-1三聚体免疫原的由重新设计的E2p变体形成的纳米颗粒具有增强的稳定性。在一些实施方案中,HIV-1 gp140三聚体可以通过包含上述T辅助表位的接头与E2p纳米颗粒连接。在一些其他实施方案中,可以通过短肽间隔物将T辅助表位融合至E2p亚基的C-末端,使得完全组装的E2p纳米颗粒包封由T辅助表位形成的疏水核。疏水核还起到增强对E2p纳米颗粒表面上的gp140三聚体的T细胞识别的作用。适用于这些实施方案中的用于连接E2p和T辅助表位的短肽间隔物可以是例如GGGS、GSGSG或任何其他本质上具有结构柔性的肽。

[0060] 可以根据本文所述的方案(例如,实施例1-7)和/或本领域中(例如He等人, *Nat. Comm.* 7, 12041, 2016; 和Kong等人, *Nat. Comm.* 7, 12040, 2016)已经描述的其他方法,构建本发明的支架式HIV-1三聚体免疫原。

[0061] IV. 表达HIV-1疫苗免疫原的载体和宿主细胞

[0062] 本发明提供了编码如本文所述的HIV-1疫苗免疫原和相关多肽的多核苷酸序列、具有多核苷酸序列的表达载体以及具有多核苷酸或表达构建体的宿主细胞。所述细胞可以是例如真核细胞或原核细胞,例如动物细胞、植物细胞、细菌或酵母。多种表达载体/宿主系统适用于表达本发明的融合多肽。示例包括例如微生物,例如用重组噬菌体、质粒或粘粒DNA表达载体转化的细菌;用酵母表达载体转化的酵母;感染了病毒表达载体(例如杆状病毒)的昆虫细胞系统;用病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒, CaMV; 烟草花叶病毒, TMV) 感染或用细菌表达载体(例如Ti或pBR322质粒)转化的植物细胞系统;或动物细胞系统。

[0063] 可用于本发明的载体优选包含与融合多肽编码序列可操作连接的序列,从而使得编码多核苷酸序列能转录和翻译。使得连接的融合多肽编码序列能转录的序列包括启动子,并且任选地还包括使得连接的序列能强表达的一个或多个增强子元件。术语“转录调控序列”是指启动子和任何其他序列的组合,该组合在可操作地连接的核酸序列上赋予期望的表达特征(例如,高水平表达、诱导型表达、组织或细胞类型特异性表达)。启动子序列可以是组成型或可诱导的。组成型病毒启动子的示例包括HSV、TK、RSV、SV40和CMV启动子。合适的诱导型启动子的示例包括来自诸如细胞色素P450基因、热休克蛋白基因、金属硫蛋白基因、激素诱导型基因等基因的启动子,诸如雌激素基因启动子等等。

[0064] 除了启动子/增强子元件,本发明的表达载体还可包含合适的终止子。这样的终止子包括例如人生长激素终止子,或者对于酵母或真菌宿主,包括TPI1 (Alber&Kawasaki, *J Mol Appl Genet.* 1:419-34, 1982) 或ADH3终止子 (McKnight等人, 1985, *EMBO J.* 4:2093-2099)。可用于本发明的载体还可包含聚腺苷酸化序列(例如,SV40或Ad5E1b poly(A) 序列)和翻译增强子序列(例如,来自腺病毒VA RNA的序列)。此外,可用于本发明的载体可编码将融合多肽引导至特定细胞区室的信号序列,或可替代地,可编码指导融合多肽分泌的信号。

[0065] 在一些优选的实施方案中,表达本发明的疫苗免疫原的载体是用于哺乳动物表达的病毒载体。通常,任何允许引入和表达编码本发明的融合HIV-免疫原的序列的病毒载体



对于本发明都是可接受的。在多种实施方案中,哺乳动物表达载体可用于本发明的实践中,包括腺病毒载体、质粒载体的pSV和pCMV系列、牛痘和逆转录病毒载体以及杆状病毒。例如,本发明的HIV-1疫苗免疫原可以从病毒载体pCMV3表达。

[0066] 取决于用于表达融合多肽的特定载体,各种已知细胞或细胞系可用于实施本发明。宿主细胞可以是可导入携带本发明的融合HIV-免疫原的重组载体的任何细胞,其中允许载体驱动可用于本发明的融合多肽的表达。其可以是原核的,例如许多细菌菌株中的任一种,或可以是真核的,例如酵母或其他真菌细胞,昆虫或两栖动物细胞,或哺乳动物细胞,包括例如啮齿动物细胞、猿猴或人细胞。表达本发明的融合多肽的细胞可以是原代培养的细胞,例如原代人成纤维细胞或角质形成细胞,或者可以是已建立的细胞系,例如NIH3T3、HEK293、HEK293T HeLa、MDCK、WI38或CHO细胞。在一些实施方案中,用于表达本发明的HIV-1疫苗免疫原的宿主细胞可以是如本文例示的ExpiCHO细胞或HEK293F细胞。技术人员可在表达本发明融合疫苗免疫原的培养物中容易地建立和维持选择的宿主细胞类型。可用于表达融合多肽的合适细胞系的许多其他具体示例在本领域中已描述。参见,例如,Smith等人,1983., J. Virol 46:584; Engelhard等人,1994, Proc Nat Acad Sci 91:3224; Logan和Shenk,1984, Proc Natl Acad Sci, 81:3655; Scharf等人,1994, Results Probl Cell Differ, 20:125; Bittner等人,1987, Methods in Enzymol, 153:516; Van Heeke & Schuster, 1989, J Biol Chem 264:5503; Grant等人,1987, Methods in Enzymology 153:516; Brisso等人,1984, Nature 310:511; Takamatsu等人,1987, EMBO J 6:307; Coruzzi等人1984, EMBO J 3:1671; Broglie等人,1984, Science, 224:838; Winter J和Sinibaldi R M, 1991, Results Probl Cell Differ., 17:85; Hobbs S或Murry L E in McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill New York N.Y., 第191-196页,或者Weissbach和Weissbach (1988) Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, New York, 第421-463页。

[0067] 可以通过本领域技术人员已知的许多合适方法中的任一种将表达融合多肽的载体引入所选择的宿主细胞。为了将编码融合多肽的载体引入哺乳动物细胞,所使用的方法将取决于载体的形式。对于质粒载体,可以通过许多转染方法中的任一种来导入编码融合多肽序列的DNA,转染方法包括例如脂质介导的转染(“脂质转染”)、DEAE-葡聚糖-介导的转染、电穿孔或磷酸钙沉淀。这些方法例如在Brent等人.(同上)中有详细描述。适于瞬时转染多种转化的和未转化的或原代细胞的脂转染试剂和方法是广泛可用的,使脂转染成为将构建体引入真核生物中,特别是引入培养的哺乳动物细胞中的有吸引力的方法。例如,可以使用LipofectAMINE™ (Life Technologies) 或LipoTaxi™ (Stratagene) 试剂盒。提供用于脂转染的试剂和方法的其他公司包括Bio-Rad Laboratories、CLONTECH、Glen Research、Invitrogen、JBL Scientific、MBI Fermentas、PanVera、Promega、Quantum Biotechnologies、Sigma-Aldrich和Wako Chemicals USA。

[0068] 为了长期、高收率地生产重组融合多肽,优选稳定的表达。可以不使用包含病毒复制起点的表达载体,而是使用融合多肽编码序列转化宿主细胞,所述融合多肽编码序列由适当的表达控制元件(例如启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等)和选择性标记来控制。重组载体中的选择性标记赋予对选择的抗性,并使细胞能将载体稳定整合到其染色体中。常用的选择标记包括neo,其赋予对氨基糖苷G-418的抗性(Colberre-



Garapin等人, J.Mol.Biol., 150:1, 1981); 和hygro, 其赋予对潮霉素的抗性 (Santerre, 等人, Gene, 30:147, 1984)。通过适当的选择, 转染的细胞可以包含融合多肽编码序列的整合拷贝。

#### [0069] V. 药物组合物和治疗应用

[0070] 本发明提供了使用支架式HIV-1免疫原多肽或编码本文所述疫苗多肽的多核苷酸的用于预防和治疗HIV-1感染的药物组合物和相关方法。在一些实施方案中, 本文公开的免疫原包括在药物组合物中。药物组合物可以是治疗制剂或预防制剂。通常, 该组合物另外包含一种或多种药学上可接受的赋形剂, 以及任选地其他治疗成分 (例如, 抗生素或抗病毒药)。组合物中也可以使用各种药学上可接受的添加剂。

[0071] 本发明的一些药物组合物是疫苗。对于疫苗组合物, 可以另外包括合适的佐剂。合适的佐剂的示例包括例如氢氧化铝、卵磷脂、弗氏佐剂 (Freund's adjuvant)、MPL™和IL-12。在一些实施方案中, 本文公开的支架式HIV-1免疫原可以配制为受控释放或定时释放制剂。这可以在包含缓释聚合物的组合物中或通过微囊化递送系统或生物粘附凝胶来实现。可以根据本领域公知的标准程序来制备各种药物组合物。参见, 例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第19次修订版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1995; Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson编辑, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978); 美国专利No. 4,652,441和美国专利No. 4,917,893; 美国专利No. 4,677,191和美国专利No. 4,728,721和美国专利No. 4,675,189。

[0072] 本发明的药物组合物可以容易地用于治疗受试者的HIV-1感染或引起针对受试者的HIV-1的免疫应答的各种治疗或预防应用中。例如, 可将组合物施用于受试者以诱导针对HIV-1的免疫应答, 例如, 诱导产生针对HIV-1的广泛中和的抗体。对于有发展HIV感染风险的受试者, 可以施用本发明的疫苗组合物以提供针对病毒感染的预防性保护。根据具体的受试者和条件, 本发明的药物组合物可以通过本领域普通技术人员已知的多种给药模式对受试者给药, 例如, 通过肌内途径、皮下途径、静脉内途径、动脉内途径、关节途径、腹膜内途径或肠胃外途径给药。一般而言, 在足以预防、抑制和/或改善所选的疾病或病症或其一种或多种症状的条件下, 将药物组合物施用给需要这种治疗的受试者一段时间。以足以诱导针对HIV-1的免疫应答的量施用免疫原性组合物。对于治疗应用, 组合物应包含治疗有效量的本文所述的支架式HIV-1免疫原。对于预防应用, 组合物应包含预防有效量的本文所述的支架式HIV-1免疫原。可以基于要治疗或预防的特定疾病或病症、严重程度、受试者的年龄以及特定受试者的其他个人属性 (例如, 受试者健康的总体状况和受试者免疫系统的健壮性) 来确定适当的免疫原量。有效剂量的确定还通过动物模型研究进行指导, 随后进行人类临床试验, 并通过可以显著减少受试者中目标疾病症状或状况的发生或严重程度的给药方案进行指导。

[0073] 对于预防应用, 在任何症状之前, 例如在感染之前, 提供免疫原性组合物。免疫原性组合物的预防性给药用于预防或改善任何随后的感染。因此, 在一些实施方案中, 待治疗的受试者是例如由于暴露或可能暴露于HIV而具有HIV感染或处于发展HIV感染风险中的受试者。在施用治疗有效量的所公开的治疗组合物之后, 可以监测受试者的HIV-1感染、与HIV-1感染有关的症状或两者。

[0074] 对于治疗应用, 在疾病或感染的症状发作时或之后, 例如在HIV-1感染的症状发展

之后,或在HIV-1感染的诊断之后,提供免疫原性组合物。因此,可以在预期暴露于HIV病毒之前提供免疫原性组合物,以便在暴露于或怀疑暴露于病毒之后,或在实际引发感染之后减弱预期的感染的严重性、持续时间或程度和/或相关的疾病症状。

[0075] 本发明的药物组合物可以与本领域已知的用于治疗或预防HIV感染的其他试剂组合。这些包括,例如抗体或其他抗病毒剂,例如核苷逆转录酶抑制剂,例如阿巴卡韦(abacavir)、AZT、去羟肌苷(didanosine)、恩曲他滨(emtricitabine)、拉米夫定(lamivudine)、司他夫定(stavudine)、替诺福韦(tenofovir)、扎西他滨(zalcitabine)、齐多夫定(zidovudine)等,非核苷逆转录酶抑制剂,例如地拉韦定(delavirdine)、依非韦伦(efavirenz)、奈韦拉平(nevirapine),蛋白酶抑制剂,例如氨普那韦(amprenavir)、阿扎那韦(atazanavir)、茚地那韦(indinavir)、洛匹那韦(lopinavir)、奈非马韦(nelfinavir)、奥沙普那韦(osamprenavir)、利托那韦(ritonavir)、沙奎那韦(saquinavir)、替普那韦(tipranavir)等,以及融合蛋白抑制剂,例如恩夫韦地(enfuvirtide)等。药物组合物和已知的抗HIV剂的施用可以同时或顺序地进行。

[0076] 本发明的HIV-1疫苗免疫原或药物组合物可以作为试剂盒的成分提供。任选地,这种试剂盒包括其他成分,其他成分包括包装、说明和各种其他试剂,例如缓冲液,底物、抗体或配体,例如对照抗体或配体,以及检测试剂。试剂盒中还可以提供可选的说明书。

[0077] 实施例

[0078] 提供以下实施例以说明本发明,但不限制本发明。

[0079] 实施例1:UF0<sup>2</sup>-BG三聚体的设计和表征

[0080] 当前的三聚体设计面临的主要障碍是一旦将它们从BG505扩展到其他毒株,则收率、纯度和稳定性下降。到目前为止,提出的解决方案包括(1)旨在从错误折叠的Env蛋白中分离天然样三聚体的纯化方法,例如bNAbs亲和柱、负选择、多循环SEC和组合色谱方法;以及(2)通过原子结构表达或根据数据库筛选获得的辅助突变。但是,这些解决方案本质上是经验性的,并且通常会导致次优结果,例如三聚体收率降低和Env性质的意外变化。我们之前将HR1弯曲(残基547-569)确定为Env亚稳态的主要原因(Kong等人Nat. Comm. 7, 12040, 2016)。在gp41<sub>ECTO</sub>中的该结构上的应变区域的合理的重新设计显著提高了多个HIV-1毒株的三聚体产量和纯度,但仍产生不同数量的错误折叠的Env,这表明除HR1以外的其他区域也有助于Env的亚稳态。因此,发现这些“亚稳态的次要因素”的来源可能对三聚体设计至关重要。

[0081] 我们假设,Env亚稳态的所有因素均在gp41<sub>ECTO</sub>内编码,并且UF0设计的BG505 gp41<sub>ECTO</sub>(称为UF0<sup>2</sup>-BG)可用于稳定各种HIV-1 Env。为了检验这一假设,我们从大量的HIV-1伪病毒或可用的数据库(<https://www.hiv.lanl.gov>)中选择了五个进化枝起源(A、B、C、B/C和A/E)的十个Env,并且还包括在我们之前的研究中测试过的三种Env(Kong等人, Nat. Comm. 7, 12040, 2016)。值得注意的是,此处测试的10种Env中有7种来自tier-2/tier-3分离株,对三聚体稳定性提出了重大挑战。对于每种Env, SOSIP、UF0和UF0<sup>2</sup>-BG设计的gp140构建体在ExpiCHO细胞中瞬时表达,而弗林蛋白酶被共转染以用于SOSIP构建体。在GNL纯化后,从Superdex 200 16/600色谱柱中生成了30种gp140的SEC图谱用于比较。除BG505外,所有SOSIP均显示相当大比例的聚集体(40-50ml),从而伴随着极低的收率,有时甚至没有三聚体峰值。除进化枝A/E外,UF0显著提高了三聚体的收率和纯度,其中在进化枝C中观察到了最明显的改善。UF0<sup>2</sup>-BG对十种毒株中的八种显示出优异的三聚体纯度和收率,没有或有

微量的二聚体和单体,涵盖所有七种tier-2/tier-3分离株。然后通过BN-PAGE表征所有三十种gp140构建体。总体而言,相对于SOSIP和UF0,UF0<sup>2</sup>-BG显著降低了二聚体和单体含量,从而显示出跨SEC馏分的三聚体带,但偶尔具有较低分子量的微弱带。基于此发现,我们在随后的SEC和通过BN-PAGE进行馏分分析之后,将GNL色谱柱上获得的总Env蛋白与三聚体部分进行比较。令人惊讶的是,GNL纯化的简单步骤对于衍生自tier-2进化枝-B毒株和tier-3进化枝-B/C毒株的除了两种UF0<sup>2</sup>-BG三聚体之外的所有三聚体产生了相当的纯度。接下来,通过差示扫描量热法(DSC)评估了八种纯化的UF0<sup>2</sup>-BG三聚体的热稳定性。值得注意的是,DSC图谱显示出进化枝/毒株特异性模式,其中热变性中点( $T_m$ )为60.9℃至68.4℃。在测试的八种三聚体中,UF0<sup>2</sup>-BG等同于UF0的BG505产生最高的 $T_m$ (68.4℃),其次是两种进化枝-C三聚体(65.2-66.2℃)。在没有其他空腔填充突变和二硫键的情况下,DSC数据在很大程度上反映了WT Env的热稳定性。值得注意的是,此处测试的CN54 UF0和UF0<sup>2</sup>-BG构建体包含14个突变(CN54M14),从而减少了293F产生的三聚体的聚集体。另外,选择进化枝B、C和B/C的四种UF0<sup>2</sup>-BG三聚体用于在293F细胞中表达和SEC纯化。结果表明,无论使用哪种细胞系,UF0<sup>2</sup>-BG都能改善三聚体性质,但仅仅与ExpiCHO系统结合使用时才能达到最高纯度,这与我们对BG505的发现是一致的。

[0082] 因此,结果证实了我们的假设,即gp41<sub>ECTO</sub>是Env亚稳态的唯一来源,而UF0设计的BG505 gp41<sub>ECTO</sub>可以稳定各种HIV-1 Env。在SEC纯化之前和之后,三聚体纯度几乎相同,这表明简单、稳定、成本有效的UF0<sup>2</sup>-BG三聚体的制备工艺。三聚体固有的纯度也将加速表达UF0<sup>2</sup>-BG三聚体的核酸疫苗的开发和临床测试。

[0083] 实施例2:来自不同亚型的UF0<sup>2</sup>-BG三聚体的纳米颗粒呈递

[0084] 遵循我们先前报道的设计策略(He等人,Nat. Comm. 7, 12041, 2016),我们研究了衍生自不同HIV-1毒株的UF0<sup>2</sup>-BG三聚体是否可以展示在24-聚合铁蛋白(FR)纳米颗粒上。我们假设,UF0设计的BG505 gp41<sub>ECTO</sub>可以同时促进gp140三聚化和纳米颗粒组装(图1A)。为了检验该假设,我们设计了八种UF0<sup>2</sup>-BG-FR构建体,其gp41<sub>ECTO</sub>的C-末端(残基664)与铁蛋白亚基的N-末端(Asp5)融合。所得融合构建体在ExpiCHO细胞中瞬时表达,然后使用2G12亲和柱进行简单纯化。对于所有研究的八种毒株,BN-PAGE均显示出与结构良好的UF0<sup>2</sup>-BG-FR纳米颗粒对应的独特的高分子量谱带。一致地,通过负染色EM证实了纳米颗粒的组装,其显示可见的颗粒核,该颗粒核装饰有从表面突出的规则阵列的gp140三聚体。DSC分析表明,对于衍生自所有五个亚型的UF0<sup>2</sup>-BG-FR纳米颗粒而言,其热稳定性高, $T_m$ 为68℃至70℃。使用六种bNAbs和四种非NAbs的组评估了五种代表性设计的UF0<sup>2</sup>-BG-FR纳米颗粒的抗原性。总体而言,多价展示已保留并在某些情况下增强了天然样三聚体的抗原性,这显示了表位和亚型的特异性模式。对于V2顶点,所有五种纳米颗粒都以比单个三聚体相当或明显更高的亲和力与PGDM1400结合,这证实了纳米颗粒表面上显示的三聚体采用了天然的封闭构象。对于H078.14,恢复的bNAbs结合可以通过纳米颗粒表面上邻近三聚体影响的构象平衡移动来解释,而对于Du172.17和93JP\_NH1,亲和力增加可能是亲合效应的结果。相比之下,很少观察到纳米颗粒与另一种顶点bNAbs(PG16)结合的改善。对于N332超级位点和CD4bs,多价展示对H078.14 UF0<sup>2</sup>-BG三聚体表现出更有利的作用。对于gp120-gp41界面,虽然所有UF0<sup>2</sup>-BG-FR纳米颗粒均保留了其三聚体与PGT151(该PGT151吸收了两个相邻gp140原型分子的元素)的结合,但对于35022观察到结合信号的跨进化枝的减少,其仅与一个启动子相互作用。对于

非NAb, 纳米颗粒表现出类似于三聚体的结合图谱。

[0085] 我们接下来检查了60单位的超稳定纳米颗粒I3-01 (Hsia等人, *Nature* 535, 136-139, 2016) 用于天然样Env三聚体的多价展示的效用。就对称性(十二面体)和尺寸(25nm)而言, I3-01与我们先前研究中测试的60聚体E2p纳米颗粒非常相似, 但稳定性更高(图1E, 左)。然而, I3-01亚基的N末端之间的大间距( $\sim 50.5\text{\AA}$ )要求长的接头以与gp140三聚体的C末端连接(图1E, 中间)。我们假设, T辅助细胞表位不仅可以用作gp140和I3-01亚基之间的接头, 而且还可以用作嵌入的T辅助信号, 以诱导稳健的T细胞应答并将B细胞导向bNAb发育。为了验证这一假设, 选择Pan DR表位肽(PADRE) AKFVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:1) (Alexander等人, *Immunity* 1, 751-761, 1994) 和两个最近报道的T辅助表位D和TpD (Fraser等人, *Vaccine* 32, 2896-2903, 2014) 以进行评估(图1E, 右)。设计了三种融合构建体, 其包含HR1重新设计的BG505 gp140 (Kong等人, *Nat. Comm.* 7, 12040, 2016)、T辅助表位和I3-01亚基。在ExpiCHO细胞中弗林蛋白酶共表达后, 通过SEC对2G12纯化的材料进行了表征(图1F)。值得注意的是, 包含PADRE的I3-01构建体产生了高纯度的纳米颗粒, 其进一步通过BN-PAGE(图1G)和负染色EM(图1h)证实。当使用相同组的bNAbs和非NAbs进行评估时, 该纳米颗粒显示出出色的抗原特性, 具有到目前为止对于任何测试的纳米颗粒都没有观察到的很强的PG16结合力(图1I)。

[0086] 总之, 我们的结果表明, 多种HIV-1毒株的UF0<sup>2</sup>-BG三聚体可以在铁蛋白纳米颗粒上展示。另外, 使用超稳定的纳米颗粒例如I3-01和T辅助表位为开发具有更平衡的T和B细胞反应的多价HIV-1疫苗提供了新颖的平台。

[0087] 实施例3: 纳米颗粒有效激活表达bNAb的B细胞

[0088] 先前, 我们证明了各种BG505 gp120和gp140纳米颗粒可以与表达同源VRC01受体的B细胞结合 (He等人, 2016)。在这项研究中, 我们通过五种UF0<sup>2</sup>-BG-FR纳米颗粒和BG505 gp140-PADRE-I3-01纳米颗粒相对于单独的三聚体评估了B细胞活化(图2)。在测定中使用表达bNAbs PGT145、VRC01和PGT121的B细胞 (Ota等人, *J. Immunol.* 189, 4816-4824, 2012)。总体而言, 三聚体呈递的纳米颗粒可以比单独的三聚体更有效地刺激表达bNAb的B细胞, 其峰值信号接近离子霉素导致的最大活性。然而, 结果还揭示了与所检查的表位有关的模式: 在表达PGT121的B细胞中进行测试从而识别出N332超级位点时, 一些三聚体和所有纳米颗粒均提供了可检测的Ca<sup>2+</sup>磁通信号; 相比之下, 没有三聚体激活表达分别靶向V2顶点和CD4bs的PGT145和VRC01的B细胞。值得注意的是, H078.14 UF0<sup>2</sup>-BG-FR纳米颗粒刺激表达PGT145的B细胞提供了进一步的证据, 即可以通过多价展示来恢复顶点(apex)而不发生V2突变, 这与BLI数据一致(图1D)。对于进化枝-A/E 93JP\_NH1 UF0<sup>2</sup>-BG-FR纳米颗粒, 也观察到了类似的效果, 其仅通过BLI弱结合到PGT121, 但在表达PGT121的B细胞中诱导了可见的、持久的Ca<sup>2+</sup>磁通信号, 这表明B细胞受体(BCR)交联于细胞表面可提供其他帮助来克服固有的低亲和力。通过将生物化学、结构和抗原学方法与B细胞活化分析相结合, 我们建立了一组gp140纳米颗粒, 其应该使得能体内对其疫苗潜力进行调查。

[0089] 实施例4在野生型小鼠中诱导自体中和抗体

[0090] 已经评估了各种形式的天然样Env三聚体的免疫原性。当用SOSIP三聚体免疫处理野生型小鼠时, 在18周内未观察到对BG505.N332的自体tier-2NAb应答 (Hu等人, *J. Virol.* 89, 10383-10398, 2015)。结论是, 形成良好的Env三聚体的聚糖屏蔽物由于鼠抗体

短的重链互补决定区3 (HCDR3) 环,因此无法穿透鼠抗体。尽管如此,据报道,具有敲入bNAb前体的小鼠中,经修饰的BG505 SOSIP三聚体可引发tier-2NAb。据报道,使用为期六个月至一年的疫苗接种方案,天然样三聚体在兔中诱导自体tier-2 TiNAb反应,在猕猴中诱导此类反应较弱(de Taeye等人,2015;Klasse等人,2016;Martinez-Murillo等人,2017;Pauthner等人,2017;Sanders等人,2015)。因此,诱导tier-2 NAb仍然是HIV-1疫苗开发的重大挑战,特别是在WT鼠标模型中。

[0091] 在此,我们用BG505 gp140三聚体和含有HR1重新设计的颗粒(UF0设计的核(Kong等人,2016a))免疫处理WT BALB/c小鼠,其中使用简单的六周方案和血清IgG纯化程序消除非特异性抗病毒活性(图3A)。PIKA(一种人类佐剂,已在I期狂犬病疫苗试验中显示出增强的T细胞和抗体反应(Wijaya等人,2017))用于提供与人类相容的疫苗制剂。总共测试了八种三聚体和四种纳米颗粒(图3B,顶部),其中通过ELISA评估了血清IgG的组合组的抗原结合(图3B,底部)。一个V1V2和两个N332纳米颗粒探针分别用于评估B细胞对顶点和N332超级位点的反应(Morris等人,2017)。我们首先检查了由293F和ExpiCHO产生的三聚体(S1G3和S1G4)引发的小鼠IgG,它们与293F产生的探针表现出差异结合,从而证实了糖基化和B细胞反应的细胞系特异性模式(图1D和1E)。与我们之前的报告(Morris等人2017)一致,三种支架化gp140.681三聚体在小鼠中引起强烈的IgG反应,如较低的EC50值(S1G5、S1G6和S1G7)所示。铁蛋白纳米颗粒(S2G1)似乎引起了对N332超级位点的更强的抗体反应,这表明了多价展示的积极作用。所有三种gp140-T-表位-I3-10-1纳米颗粒(S2G5、S2G6和S2G7)均胜过它们各自在C-末端包含PADRE、D和TpD表位的三聚体(S1G8、S1G9和S1G10)。最后,在最初的筛选中,以3-8mg/ml的IgG浓度测试了来自十二个经免疫处理的组的血清IgG的HIV-1中和作用,其中未经免疫处理的组作为对照(S1G10)(图3C)。与先前的负报道相反(Hu等人,同上),对于支架式gp140.681三聚体(S1G5)、铁蛋白纳米颗粒(S2G1)和两个I3-01纳米颗粒(S2G5和S2G6),观察到自体tier-2BG505.N332的中和作用。在较低的IgG浓度(1mg/ml)下进行测试时,S1G5显示出临界中和值刚好低于阈值(图3D),而S2G1中的一名受试者(图3E)和S2G5中的两名受试者似乎已经发展了自体tier-2BG505.N332的NAb(图3F)。特别地,gp140-PADRE-I3-10-1纳米颗粒不仅表现出突出的纯度、结构均质性和抗原性(图1,E-1),而且还产生了指示仅在八周后tier-2NAb快速发展的IC<sub>50</sub>值。这些数据表明,在兔、NHP和人类中,与目前的三聚体疫苗相比,用gp140-PADRE-I3-10-1纳米颗粒进行免疫可以诱导更有效的tier-2NAb应答,也可能具有改善的宽度。

[0092] 实施例5用于呈递HIV-1 gp140三聚体的其他超稳定纳米颗粒

[0093] 除了I3-01纳米颗粒外,我们还检查了用于构建本文所述的gp140-T辅助表位-纳米颗粒平台HIV-1疫苗免疫原的其他稳定的纳米颗粒。具体而言,我们测试了蛋白“来自海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)的2-脱氢-3-脱氧磷酸葡萄糖酸醛缩酶4-羟基-2-酮戊二酸醛缩酶(Tm0066)”,其具有2.30埃的晶体结构分辨率(PDB ID:1VLW)。以编码1VLW的基因序列为基础,以2.30 Å分辨率的晶体结构为骨架,设计可以自动组装成具有比I3-01更理想的特性的60聚体纳米颗粒的蛋白。对1VLW序列(SEQ ID NO:5)中的十一个氨基酸进行基于整体的蛋白设计,或目视检查,然后进行手动设计。合成了十二个设计的1VLW突变体(SEQ ID NO:6-17)。通过与上述针对gp140-PADRE-I3-01纳米颗粒免疫原所述的方案相同的方案,检查在这些序列的纳米颗粒上展示的gp140三聚体的构建、纳米颗粒免疫原的表达及其

免疫原性。

[0094] 1VLW野生型氨基酸序列(SEQ ID NO:5) (用下划线标记要重新设计的残基):

MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKEKALAVFEGGVHLEITFTVPDADTVIKELSFL  
KEKGAIIGAGTVTSVEQCRKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTTE  
[0095] LVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPFVKAMKGPFNPVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLA  
VGVSALVKGTPDEVREKAKAFVEKIRGCTE

[0096] 重新设计的用于展示gp140三聚体的1VLW变体(SEQ ID NO:6-17) (修饰的残基用双下划线标出):

[0097] >1VLW-SS1(SEQ ID NO:6)

MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKALAVFLGGVHLEITFTVPDADTVIKELSFL  
KEMGAIIGAGTVTSVEQCRKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTTE  
[0098] LVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPFVKAMKGPFNPVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLA  
VGVSALVKGTPCEVACKAKAFVEKIRGCTE

[0099] >1VLW-MUT(SEQ ID NO:7)

MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKWKALAVFIGGVHLEITFTVPDADTVIKELSFL  
KELGAIIGAGTVTSVEQCRKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTTE  
[0100] LVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPFVKAMKGPFNPVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLA  
VGVSALVKGTPAEVVEKAKAFVEKIRGCTE

[0101] >1VLW-JZ1(SEQ ID NO:8)

MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKMKALHVFSGGVHLEITFTVPDADTVIKELSFL  
KEQGAIIGAGTVTSVEQCRKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTTE  
[0102] LVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPFVKAMKGPFNPVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLA  
VGVSALVKGTWDEVSRKAKAFVEKIRGCTE

[0103] >1VLW-JZ2(SEQ ID NO:9)

MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKWKALHVFTGGVHLEITFTVPDADTVIKELSFL  
KEQGAIIGAGTVTSVEQCRKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTTE  
[0104] LVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPFVKAMKGPFNPVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLA  
VGVSALVKGTWHEVAAKAKAFVEKIRGCTE

[0105] >1VLW-JZ3(SEQ ID NO:10)

MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKMKALHVFTGGVHLEITFTVPDADTVIKELSFL  
KEWGAIIGAGTVTSVEQCRKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTTE  
[0106] LVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPFVKAMKGPFNPVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLA  
[0107] VGVSALVKGTWDEVAAKAKAFVEKIRGCTE

[0108] >1VLW-JZ4(SEQ ID NO:11)

MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKALAVFLAGVHLEITFTVPDADTVIKELSFL  
KEMGAIIGAGTVTSVEQCRKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTTE  
[0109] LVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPFVKAMKGPFNPVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLA  
VGVSALVKGTVVEVAAKAAAFVEKIRGCTE

[0110] >1VLW-JZ5(SEQ ID NO:12)

MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKALAVFLGGVHLEITFTVPDADTVIKELSFL  
KEMGAIIGAGTVTSVEQCRKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTTE  
[0111] LVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPFVKAMKGPFNPVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLA  
VGVSALVKGTIVEVAAKAAAFVEKIRGCTE

[0112] >1VLW-JZ6(SEQ ID NO:13)

[0113] MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKKA~~LA~~VFLGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSFL  
KE~~MG~~AIIGAGTVTSVEQCRKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTTE  
LVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLA  
VGVGSA~~LV~~KGT~~W~~EV~~AA~~KA~~AA~~AFVEKIRGCTE

[0114] >1VLW-JZ7 (SEQ ID NO:14)

[0115] MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKMKA~~LQ~~VFVGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSFL  
KE~~AG~~AIIGAGTVTSVEQCRKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTTE  
LVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLA  
VGVGSA~~LV~~KGT~~LA~~EV~~AA~~KA~~EA~~AFVEKIRGCTE

[0116] >1VLW-JZ8 (SEQ ID NO:15)

[0117] MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKWKA~~LH~~VFVGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSFL  
KE~~AG~~AIIGAGTVTSVEQCRKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTTE  
LVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLA  
VGVGSA~~LV~~KGT~~WA~~EV~~AA~~KA~~KA~~AFVEKIRGCTE

[0118] >1VLW-JZ9 (SEQ ID NO:16)

[0119] MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKMKA~~LA~~VFVGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSFL  
KE~~L~~GAIIGAGTVTSVEQCRKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTTE  
LVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLA  
VGVGSA~~LV~~KGT~~IA~~EV~~AA~~KA~~AA~~AFVEKIRGCTE

[0120] >1VLW-JZ10 (SEQ ID NO:17)

[0121] MKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKMKA~~LA~~VFVGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSFL  
KE~~AG~~AIIGAGTVTSVEQCRKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTTE  
LVKAMKLGHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFVPTGGVNLDNVCEWFKAGVLA  
VGVGSA~~LV~~KGT~~F~~EV~~AA~~KA~~AA~~AFVEKIRGCTE

[0122] 实施例6一些示例性实验程序

[0123] 抗体:我们利用成组的bNAb和非NAb来表征多种天然样三聚体和gp140纳米颗粒的抗原性。抗体从NIH AIDS试剂计划 (<https://www.aidsreagent.org/>) 要求提供,但bNAbs PGDM1400、PGT145、PGT121和PGT151以及非NAb 19b是从斯克利普斯研究院 (Scripps Research Institute) 内部获得的。

[0124] HIV-1 Env三聚体和纳米颗粒的表达和纯化:三聚体在HEK293 F或ExpiCHO细胞 (Thermo Fisher) 中瞬时表达,除了用于晶体学分析的材料外。先前已经描述了用于在HEK293 F细胞中三聚体生产的方案 (Kong等人,同上;Morris等人,mBio 8,e00036-00017, 2017)。对于裂解的HR1重新设计的三聚体,在转染过程中加入弗林蛋白酶质粒。用于ExpiCHO细胞中三聚体和纳米颗粒生产的方案如下所述。简而言之,将ExpiCHO细胞解冻,并在37℃,以135rpm和8%CO<sub>2</sub>,在振动培养箱中,用ExpiCHO™表达培养基 (Thermo Fisher) 温育。当细胞达到10×10<sup>6</sup>ml<sup>-1</sup>的密度时,添加ExpiCHO™表达培养基以将细胞密度降低至6×10<sup>6</sup>ml<sup>-1</sup>用于转染。按照制造商的指示,准备将ExpiFectamine™ CHO/质粒DNA复合物在ExpiCHO细胞中进行200ml转染。对于SOSIP和HR1重新设计的三聚体以及呈递BG505 HR1重新设计的三聚体的I3-01纳米颗粒,将160μg抗原质粒、60μg弗林蛋白酶质粒和640μl ExpiFectamine™ CHO试剂混合在15.4ml冷OptiPRO™培养基 (Thermo Fisher) 中,而对于UFO和UFO<sup>2</sup>三聚体以及UFO<sup>2</sup>-BG-FR纳米颗粒,则使用200μg不含弗林蛋白酶的抗原质粒。在第1天第一次补料后,按照Max Titer方案,在32℃下,以120rpm和8%CO<sub>2</sub>,在振动培养箱中培养ExpiCHO细胞,在第5天另外补料 (Thermo Fisher)。转染后13至14天收获培养上清液,通过以4000rpm离心20分钟进行澄清,然后使用0.45μm过滤器 (Thermo Fisher) 过滤。对于三



聚体(timers),使用Garanthus nivalis凝集素(GNL)色谱柱(Vector Labs)从上清液中萃取Env蛋白,而对于纳米颗粒,使用2G12亲和柱纯化Env-融合蛋白。可通过尺寸排阻色谱法(SEC)在Superdex 200 Increase 10/300GL色谱柱或HiLoad 16/600 Superdex 200PG色谱柱(GE Healthcare)上进一步纯化三聚体。用Superose 6 10/300 GL色谱柱通过SEC表征13-03纳米颗粒的纯度。对于三聚体和纳米颗粒,使用具有理论消光系数的 $UV_{280}$ 吸光度测定蛋白浓度。

[0125] 分析总的和位点特异性的糖基化图谱:通过HILIC-UPLC生成ExpiCHO和293 F产生的三聚体的总聚糖谱。通过肽-N-糖苷酶F(PNGase F)的凝胶内消化,从包膜糖蛋白中酶促释放N-连接的聚糖,随后用2-氨基苯甲酸(2-AA)进行荧光标记,并通过HILIC-UPLC进行分析。用Endo H消化释放的聚糖,可定量寡甘露糖型聚糖。使用离子迁移率MS通过PNGase F消化分析从三聚体释放的聚糖来确定聚糖的组成。用装有纳米电喷雾离子源的Waters Synapt G2Si质谱仪(Waters Corp.)记录负离子质量、碰撞诱导解离(CID)和离子迁移谱。使用Waters Driftscope(2.8版)软件和MassLynx™(4.1版)进行数据采集和处理。如先前所述(Harvey等人,Anal.Biochem.376,44-60,2008)解释光谱。获得的结果作为创建样品特异性聚糖文库的基础,该文库用于后续的位点特异性N糖基化分析。对于位点特异性N-糖基化分析,在消化之前,通过以下方式将三聚体变性并烷基化:在室温(RT)下于50mM Tris/HCl、pH 8.0缓冲液中温育1小时,该缓冲液含有6M尿素和5mM二硫苏糖醇(DTT),随后在黑暗中于室温再添加20mM碘乙酰胺(IAA)持续1小时,然后再添加DTT(20mM)持续另外1小时,以消除任何残留的IAA。将烷基化的三聚体缓冲液使用Vivaspin柱交换成50mM Tris/HCl,pH 8.0,并分别用胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶(质谱等级,Promega)以1:30(w/w)的比例消化。使用ProteoExtract糖肽富集试剂盒(Merck Millipore)从蛋白酶消化的样品中选择糖蛋白。使用高能碰撞解离(HCD)碎片,利用Orbitrap融合质谱仪(Thermo Fisher Scientific),通过LC-ESI MS分析富集的糖蛋白肽。使用Byonic™(2.7版)和Byologic™软件(2.3版;Protein Metrics Inc.)进行数据分析和糖蛋白肽鉴定。

[0126] BN-PAGE:Env蛋白和纳米颗粒通过蓝色天然聚丙烯酰胺凝胶电泳(BN-PAGE)分析,并用考马斯亮蓝染色。将蛋白样品与加载G250的染料混合,并添加到4-12%Bis-Tris NuPAGE凝胶(Life Technologies)中。根据制造商的说明,使用NativePAGE™运行缓冲液(Life Technologies)在150V下将BN-PAGE凝胶运行2.5小时。

[0127] 差示扫描量热法(DSC):UF0<sup>2</sup>-BG三聚体、UF0<sup>2</sup>-U三聚体和三聚体呈递纳米颗粒的热稳定性在以下条件下测量:使用MicroCal VP-毛细管量热仪(Malvern),在PBS缓冲液中,20℃至120℃,扫描速率为90℃h<sup>-1</sup>。使用VP-Capillary DSC自动化数据分析软件分析数据。

[0128] 用于结晶的蛋白的生产和纯化:进化枝-B tier-3H078.14 UF0<sup>2</sup>-BG三聚体在FreeStyle 293 S细胞中表达,并使用2G12偶联的亲和基质从培养上清液中纯化,随后进行尺寸排阻色谱(SEC)。将Fabs PGT124和35022瞬时转染到哺乳动物的FreeStyle 293F细胞(Invitrogen)中,并使用LC-λ捕获选择柱纯化,然后通过离子交换色谱法和Superdex 200 16/60柱上的SEC进一步纯化。通过在室温下将H078.14 UF0<sup>2</sup>-BG三聚体蛋白与PGT124和35022以1:3:2的摩尔比混合30分钟来制备三聚体复合物。为了减少三聚体复合物的异质性,对在293S细胞中产生的H078.14 UF0<sup>2</sup>-BG.664用内切糖苷酶H(New England Biolabs)在4℃过夜,进行去糖基化。通过SEC进一步纯化三聚体复合物后,对其进行晶体试验。



[0129] 蛋白结晶和数据收集:将SEC纯化的H078.14 UF0<sup>2</sup>-BG三聚体复合物浓缩至~5mg/ml,然后在4℃和20℃下进行广泛的结晶试验。含有结合至UF0<sup>2</sup>-BG三聚体的Fab PGT124和35022的蛋白复合物的晶体从0.1M乙酸钙、0.1M MES(pH 6.0)、15%(v/v)PEG400中获得,并收获且用25%甘油冷冻保护,然后立即在液氮中快速冷却。在当前条件下,最好的晶体衍射到**6.20 Å**的分辨率,并在斯坦福同步辐射光源(Stanford Synchrotron Radiation Lightsource)的光束线12-2处收集数据,用HKL-2000处理,并在P6<sub>3</sub>空间群中索引,其晶胞的完整性为99.7%。参数 **$a = b = 129.3\text{Å}$ ,  $c = 314.5\text{Å}$** 。

[0130] 结构确定和细化:与PGT124和35022结合的H078.14UF0<sup>2</sup>-BGtrimer结构通过使用Phaser利用35022:BG505 SOSIP.664结构(PDB:5CEZ)和PGT124 Fab结构(PDB:4R26)的一个启动子进行分子置换(MR)来得到。使用Phenix对结构进行了细化,其中Coot用于模型构建,而MolProbity用于结构验证。由于数据集的分辨率有限,每个残基细化使用两个B-因子组。此外,使用约束的参考模型集来实施位置坐标的细化。复杂结构的最终R<sub>cryst</sub>和R<sub>free</sub>值分别为25.0%和31.4%。图是用PyMol和Chimera生成的。在晶体结构中,根据针对FABs的Rabat定义和针对gp140的HXBc2系统对残基进行编号。

[0131] 负染色电子显微镜:通过负染色EM分析UF0<sup>2</sup>-BG三聚体和三聚体呈递纳米颗粒。将含有~0.01mg ml<sup>-1</sup>的三聚体或纳米颗粒的3μL等分试样涂在碳涂覆的400Cu网格上,持续15s,该网格已在20mA下发光放电30s,然后用2%(w/v)甲酸铀酰负染色30s。使用在120kV下操作的FEI Tecnai Spirit电子显微镜以约**25e<sup>-</sup>Å<sup>-2</sup>**的电子剂量和52,000倍的放大倍数收集数据,从而在样品平面处产生**2.05 Å**的像素大小。利用使用标称1500nm散焦Tietz 4k × 4k TemCam-F416 CMOS相机和Leginon包来采集图像。使用DoG Picker从原始显微照片中自动选择UF0<sup>2</sup>-BG三聚体颗粒,而使用Appion Manual Picker手动选择三聚体呈递纳米颗粒。使用Appion软件包将两者都放入颗粒堆中。使用按两个合并的颗粒,通过迭代多变量统计分析(MSA)/多参考比对(MRA)计算出无参考的二维(2D)类平均值,并将其分类。为了分析三聚体(天然的和非天然的)的质量,用眼睛检查无参考的二维类别平均值,如前文所述(de Taeye等人,Cell 163,1702-1715,2015)。

[0132] 生物层干涉法(BLI):使用Octet Red96仪器(fortéBio,颇尔生命科学(Pall Life Sciences))测量三聚体和纳米颗粒与bNAbs和非NAbs结合的动力学特征。所有测定均在fortéBio 1×运动缓冲液中在设置为1000rpm的搅拌条件下进行。所有溶液的最终体积为每孔200μl。在实心黑色96孔板(Geiger Bio-One)中于30℃进行测定。将在1×运动缓冲液中的5μg ml<sup>-1</sup>的抗体加载到抗人Fc Capture Biosensors(AHC)的表面上持续300s。先进行60s生物传感器基线步骤,然后再分析生物传感器上抗体与溶液中抗原的持续200s的缔合。抗原的两倍浓度梯度(对于三聚体从200nM开始,对于纳米颗粒从14-35nM开始,具体取决于大小)用于六次滴定系列中。然后进行相互作用的解离持续300秒。基线漂移的校正通过减去装载有抗体但未孵育有抗原的传感器和没有抗体但已孵育有抗原的传感器记录的位移平均值进行。Octet数据由fortéBio的数据采集软件v.8.1处理。值得注意的是,对于先导型bNAbs,将实验数据用描述2:1相互作用的结合方程式拟合,以获得最佳拟合结果。

[0133] B细胞活化测定法:先前已经描述了表达PGT121、PGT145或VRC01的K46 B细胞系的产生(Ota等人,J. Immunol. 189,4816-48242012)。简而言之,将表达强力霉素诱导形式的

bNAb B细胞受体 (BCR) 的K46细胞保持在高级DMEM(Gibco) 中,并补充10%FCS、Pen/Strep抗生素和 $2\mu\text{g ml}^{-1}$ 的Puromycin(Gibco)。将细胞在 $1\mu\text{g ml}^{-1}$ 强力霉素(Clontech) 中处理过夜以诱导BCR表达。在 $37^{\circ}\text{C}$ 下以 $1\text{pM}$ 装载Indo-1(Molecular Probes) 1小时后,洗涤的细胞用以下指示剂以 $10\mu\text{g/ml}^{-1}$ 的浓度刺激:抗小鼠IgM(Jackson ImmunoResearch);UF0<sup>2</sup>-BG或HR1重新设计的gp140三聚体,其中T辅助表位融合至C-末端(PADRE);UF0<sup>2</sup>-BG-FR或I3-01纳米颗粒呈递HR1重新设计的gp140三聚体。在LSR II流式细胞仪(BD) 上评估钙动员。在每次运行中,首先记录未刺激的B细胞60s,加入测试免疫原,充分混合,并记录180s,然后加入 $1\mu\text{l}$ 的 $1\mu\text{g ml}^{-1}$ 离子霉素(Sigma) 并记录另一个60s来验证indo加载。

[0134] 小鼠免疫和血清IgG纯化:七周大的BALB/c小鼠购自The Jackson Laboratory。依照批准的IACUC方案和AAALAC指南,将小鼠圈养在斯克利普斯研究院(TSRI) 的环境受控房间的通风笼中。在第0周时,按照制造商的指示,通过腹膜内(i.p.) 途径用200ml的抗原/佐剂混合物免疫每只小鼠,该混合物含有50 $\mu\text{g}$ 的抗原和100 $\mu\text{l}$ 的AddaVax佐剂(Invivogen) 或50 $\mu\text{l}$ 的PIKA佐剂(Yisheng Biopharma)。在第3周和第6周,用50 $\mu\text{g}$ 在AddaVax或PIKA佐剂中配制的抗原对所述动物进行加强免疫。在第8周,使用肝素化的毛细管使所述动物最终通过眶后膜放血。样品用等体积的PBS稀释,然后将其放在15ml SepMate管(StemCell) 中的4.5ml Ficoll/Histopaque上,并于 $20^{\circ}\text{C}$ 以1200RPM离心10分钟以分离血浆和细胞。将血浆在 $56^{\circ}\text{C}$ 加热灭活1小时,以1200RPM离心10分钟,然后无菌过滤。将细胞在PBS中洗涤一次,然后重悬于1ml的ACK红细胞裂解缓冲液(Lonza) 中。用PBS洗涤2轮后,将PBMC重悬于2ml的Bambanker冷冻培养基(Lymphotec Inc.) 中。还收获脾脏并将其抵靠40 $\mu\text{m}$ 细胞滤网(BD Falcon) 研磨(grounded),以将脾细胞释放到细胞悬液中。将细胞离心,在PBS中洗涤,然后根据制造商的规格用10ml RBC裂解缓冲液处理,并重悬在Bambanker冷冻培养基中以进行细胞冷冻。按照制造商的说明,使用0.2ml蛋白G旋转试剂盒(Thermo Scientific) 纯化每只小鼠总血清的三分之一,或600 $\mu\text{l}$ 血清。将从每组中的四只小鼠获得的纯化的血清IgGs组合以通过ELISA和HIV-1中和测定来表征。

[0135] 酶联免疫吸附测定法(ELISA):首先将Costar™ 96孔测定板(Coming) 的每个孔用含有0.2 $\mu\text{g}$ 适当抗原的50 $\mu\text{L}$  PBS涂覆。将板在 $4^{\circ}\text{C}$ 下温育过夜,然后用含有PBS和0.05% (v/v) Tween 20的洗涤缓冲液洗涤五次。然后,将每个孔用150 $\mu\text{l}$ 由PBS、20 $\text{mg ml}^{-1}$ 印迹级阻滞剂(Bio-Rad) 和5% (v/v) FBS组成的封闭缓冲液涂覆。将板用封闭缓冲液在室温下温育1小时,然后用洗涤缓冲液洗涤5次。将纯化的小鼠IgG在封闭缓冲液中稀释至最大浓度为100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ,然后进行10倍稀释系列。对于每种抗体稀释液,将总共50 $\mu\text{l}$ 的体积加入适当的孔中。将每个板在室温下温育1小时,然后用洗涤缓冲液洗涤5次。然后在洗涤缓冲液中制备辣根过氧化物酶(HRP) 标记的山羊抗小鼠IgG抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories) 的1:2000稀释液,向每个孔中加入50 $\mu\text{l}$ 这种稀释的二抗。将板与二抗在室温下温育1小时,然后用洗涤缓冲液洗涤5次。最后,在用50 $\mu\text{l}$  2N硫酸使反应停止之前,用50 $\mu\text{l}$  TMB(Life Sciences) 将孔显影3-5分钟。在450nm的波长下测量所得的板读数。

[0136] 伪病毒产生和中和测定:如前所述,通过用HIV-1 Env表达质粒和Env缺陷型基因组骨架质粒(pSG3AEnv) 转染293T细胞来产生伪病毒。转染72小时后收集伪病毒,以用于中和测定。如前所述,使用单轮复制伪病毒测定和TZM-b1靶细胞评估纯化的小鼠血清IgG的中和活性。简而言之,将TZM-b1细胞接种在96孔平底板中。向该板中添加伪病毒,将其与小鼠

血清IgG的系列稀释液在37℃下预温育1小时。在裂解和添加Bright-Glo™荧光素酶底物(Promega)后,感染后72小时定量荧光素酶报告基因的表达。为了确定IC<sub>50</sub>值,通过非线性回归拟合剂量反应曲线。

[0137] 小鼠库的测序和生物信息学分析:如前所述,已经开发了5'-RACE方案用于小鼠B细胞库的无偏测序。简而言之,使用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen)从每只小鼠的总PBMC中提取RNA(包括mRNA)到30μl水中。5'-RACE用SMARTer RACE cDNA扩增试剂盒(Clontech)进行。免疫球蛋白PCR用总体积为50μl的Platinum Taq高保真DNA聚合酶(Life Technologies),利用5μl cDNA(作为模板)、1μl 5'-RACE引物以及1μl 10mM反向引物来进行。5'-RACE引物包含PGM/S5 P1衔接子,而反向引物包含PGM/S5 A衔接子。我们将小鼠3'-C<sub>γ</sub>1-3和3'-C<sub>μ</sub>内引物用作反向引物,以用于重链的5'-RACE PCR处理。总共进行25个PCR循环,并将预期的PCR产物(500-600bp)进行凝胶纯化(Qiagen)。NGS在Ion S5系统上执行。简而言之,来自同一组的重链文库使用带有Qubit® dsDNA HS分析试剂盒的Qubit®2.0荧光计进行定量,然后以1:1:1:1的比例混合以进行测序。使用Ion 520/530 Ext试剂盒在Ion Chef上执行模板制备和(Ion 520)芯片加载,然后在Ion S5系统上使用默认设置进行测序。小鼠抗体组学管线用于处理原始数据并确定重链种系基因使用情况的分布。

#### [0138] 实施例7:T-辅助表位包封的纳米颗粒

[0139] 尽管使用T辅助表位作为连接HIV-1 gp140和纳米颗粒主链的接头产生了具有期望的抗原和免疫原性的HIV-1三聚体呈递纳米颗粒(图1-3),但是这种纳米颗粒的组装似乎受到暴露在纳米颗粒表面的疏水性T辅助表位的影响。为了改善纳米颗粒的组装和纯度,研究了将T细胞辅助表位整合到纳米颗粒疫苗设计中的替代策略。代替在外表面的抗原和纳米颗粒主链之间插入T辅助表位,该T辅助表位通过短的柔性肽间隔物遗传融合至纳米颗粒亚基的C-末端。预期的结果将是一种纳米颗粒疫苗,其外表面展示二十个HIV-1 gp140三聚体,并在纳米颗粒壳内部包封六十个疏水性T辅助表位(图4A)。该设计是基于以下观察结果而设计的:E2p和I3-01都是具有中空内部的大型60聚体纳米笼,几乎所有蛋白都偏好疏水核和带电/亲水表面,以实现溶液的稳定性。

[0140] 我们用泛反应性T辅助表位PADRE测试了该策略。在构建体设计中,用1G间隔物(针对E2p)或10aa GGGGSGGGGS间隔物(针对I3-01)(两者均在间隔物之前包含酶促位点(AS))将HIV-1 BG505 gp140的C-末端融合到纳米颗粒亚基的N-末端,然后用5aa GGGGS间隔物将PADRE的N-末端融合至纳米颗粒亚基的C-末端。两种得到的融合构建体在25ml的ExpiCHO细胞中瞬时表达,并使用2G12抗体亲和柱纯化。通过尺寸排阻色谱法(SEC)在Superose 6 10/300 GL柱上分析获得的蛋白。对于这两种构建体,我们观察到在6-7mL处的峰对应于形成良好的纳米颗粒(图4B)。考虑到较小规模的转染(图1F中为25ml对100ml),与其中将T-辅助表位用作纳米颗粒外部的接头的设计相比,实际纳米颗粒的收率显著提高。通过负染色EM对2G12纯化的纳米颗粒进行进一步分析。可以从源自负染色EM的原始显微照片中识别出表面上带有刺突的完全组装的纳米颗粒(图4C)。SEC和EM数据两者合计证实,T辅助表位的包封可以为设计带有嵌入式T细胞辅助的HIV-1纳米颗粒疫苗提供有效的策略。

[0141] T辅助表位可以通过短肽间隔物融合到自组装纳米颗粒的亚基的C-末端。HIV-1 gp140的C-末端可融合到上述纳米颗粒的亚基的N-末端。当这些融合亚基组装成纳米颗粒时,它将在纳米颗粒的外表面上呈递8或24个HIV-1 gp140三聚体,同时将24或60个T辅助表

位包封在纳米颗粒壳内。纳米颗粒外表面上的HIV-1 gp140三聚体将诱导抗HIV-1B细胞反应,而纳米颗粒内部的密集的T辅助表位簇将在消化纳米颗粒蛋白时诱导广泛的反应性T细胞反应。

[0142] 因此,已经参考上述代表性实施方案对本发明进行了广泛的公开和说明。应理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对本发明进行各种修改。

[0143] 还应注意,本文引用的所有出版物、序列登录号、专利和专利申请均通过引用整体地并出于所有目的明确地并入本文,如同各自单独地如此指出。在与本公开中的定义相抵触的程度上,排除通过引用并入的文本中包含的定义。

## 序列表

<110> 斯克利普斯研究院  
 <120> 新型支架式HIV-1疫苗免疫原  
 <130> 1839.1PC  
 <150> US 62/580,038  
 <151> 2017-11-01  
 <160> 20  
 <170> PatentIn版本3.5(PatentIn version 3.5)  
 <210> 1  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 合成序列(Synthetic sequence)  
 <400> 1  
 Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10

[0001] <210> 2  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 合成序列(Synthetic sequence)  
 <400> 2  
 Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro  
 1 5 10 15

<210> 3  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 合成序列(Synthetic sequence)  
 <400> 3  
 Ile Leu Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Pro  
 1 5 10 15  
 Met Gly Leu Pro Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln  
 20 25 30

<210> 4  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
 <223> 合成序列(Synthetic sequence)

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5

<210> 5  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> 海栖热袍菌(Thermotoga maritima)

<400> 5

Met Lys Met Glu Glu Leu Phe Lys Lys His Lys Ile Val Ala Val Leu  
 1 5 10 15

Arg Ala Asn Ser Val Glu Glu Ala Lys Glu Lys Ala Leu Ala Val Phe  
 20 25 30

[0002] Glu Gly Gly Val His Leu Ile Glu Ile Thr Phe Thr Val Pro Asp Ala  
 35 40 45

Asp Thr Val Ile Lys Glu Leu Ser Phe Leu Lys Glu Lys Gly Ala Ile  
 50 55 60

Ile Gly Ala Gly Thr Val Thr Ser Val Glu Gln Cys Arg Lys Ala Val  
 65 70 75 80

Glu Ser Gly Ala Glu Phe Ile Val Ser Pro His Leu Asp Glu Glu Ile  
 85 90 95

Ser Gln Phe Cys Lys Glu Lys Gly Val Phe Tyr Met Pro Gly Val Met  
 100 105 110

Thr Pro Thr Glu Leu Val Lys Ala Met Lys Leu Gly His Thr Ile Leu  
 115 120 125

Lys Leu Phe Pro Gly Glu Val Val Gly Pro Gln Phe Val Lys Ala Met  
 130 135 140

Lys Gly Pro Phe Pro Asn Val Lys Phe Val Pro Thr Gly Gly Val Asn  
 145 150 155 160

Leu Asp Asn Val Cys Glu Trp Phe Lys Ala Gly Val Leu Ala Val Gly  
165 170 175

Val Gly Ser Ala Leu Val Lys Gly Thr Pro Asp Glu Val Arg Glu Lys  
180 185 190

Ala Lys Ala Phe Val Glu Lys Ile Arg Gly Cys Thr Glu  
195 200 205

<210> 6  
<211> 205  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成序列(Synthetic sequence)

<400> 6

Met Lys Met Glu Glu Leu Phe Lys Lys His Lys Ile Val Ala Val Leu  
1 5 10 15

Arg Ala Asn Ser Val Glu Glu Ala Lys Lys Lys Ala Leu Ala Val Phe  
20 25 30

[0003]

Leu Gly Gly Val His Leu Ile Glu Ile Thr Phe Thr Val Pro Asp Ala  
35 40 45

Asp Thr Val Ile Lys Glu Leu Ser Phe Leu Lys Glu Met Gly Ala Ile  
50 55 60

Ile Gly Ala Gly Thr Val Thr Ser Val Glu Gln Cys Arg Lys Ala Val  
65 70 75 80

Glu Ser Gly Ala Glu Phe Ile Val Ser Pro His Leu Asp Glu Glu Ile  
85 90 95

Ser Gln Phe Cys Lys Glu Lys Gly Val Phe Tyr Met Pro Gly Val Met  
100 105 110

Thr Pro Thr Glu Leu Val Lys Ala Met Lys Leu Gly His Thr Ile Leu  
115 120 125

Lys Leu Phe Pro Gly Glu Val Val Gly Pro Gln Phe Val Lys Ala Met  
130 135 140

Lys Gly Pro Phe Pro Asn Val Lys Phe Val Pro Thr Gly Gly Val Asn  
145 150 155 160

Leu Asp Asn Val Cys Glu Trp Phe Lys Ala Gly Val Leu Ala Val Gly  
165 170 175

Val Gly Ser Ala Leu Val Lys Gly Thr Pro Cys Glu Val Ala Cys Lys  
180 185 190

Ala Lys Ala Phe Val Glu Lys Ile Arg Gly Cys Thr Glu  
195 200 205

<210> 7  
<211> 205  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成序列(Synthetic sequence)

<400> 7

Met Lys Met Glu Glu Leu Phe Lys Lys His Lys Ile Val Ala Val Leu  
1 5 10 15

Arg Ala Asn Ser Val Glu Glu Ala Lys Trp Lys Ala Leu Ala Val Phe  
20 25 30

[0004]

Ile Gly Gly Val His Leu Ile Glu Ile Thr Phe Thr Val Pro Asp Ala  
35 40 45

Asp Thr Val Ile Lys Glu Leu Ser Phe Leu Lys Glu Leu Gly Ala Ile  
50 55 60

Ile Gly Ala Gly Thr Val Thr Ser Val Glu Gln Cys Arg Lys Ala Val  
65 70 75 80

Glu Ser Gly Ala Glu Phe Ile Val Ser Pro His Leu Asp Glu Glu Ile  
85 90 95

Ser Gln Phe Cys Lys Glu Lys Gly Val Phe Tyr Met Pro Gly Val Met  
100 105 110

Thr Pro Thr Glu Leu Val Lys Ala Met Lys Leu Gly His Thr Ile Leu  
115 120 125

Lys Leu Phe Pro Gly Glu Val Val Gly Pro Gln Phe Val Lys Ala Met  
130 135 140

Lys Gly Pro Phe Pro Asn Val Lys Phe Val Pro Thr Gly Gly Val Asn  
145 150 155 160



Leu Asp Asn Val Cys Glu Trp Phe Lys Ala Gly Val Leu Ala Val Gly  
165 170 175

Val Gly Ser Ala Leu Val Lys Gly Thr Pro Ala Glu Val Val Glu Lys  
180 185 190

Ala Lys Ala Phe Val Glu Lys Ile Arg Gly Cys Thr Glu  
195 200 205

<210> 8

<211> 205

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列(Synthetic sequence)

<400> 8

Met Lys Met Glu Glu Leu Phe Lys Lys His Lys Ile Val Ala Val Leu  
1 5 10 15

Arg Ala Asn Ser Val Glu Glu Ala Lys Met Lys Ala Leu His Val Phe  
20 25 30

[0005]

Ser Gly Gly Val His Leu Ile Glu Ile Thr Phe Thr Val Pro Asp Ala  
35 40 45

Asp Thr Val Ile Lys Glu Leu Ser Phe Leu Lys Glu Gln Gly Ala Ile  
50 55 60

Ile Gly Ala Gly Thr Val Thr Ser Val Glu Gln Cys Arg Lys Ala Val  
65 70 75 80

Glu Ser Gly Ala Glu Phe Ile Val Ser Pro His Leu Asp Glu Glu Ile  
85 90 95

Ser Gln Phe Cys Lys Glu Lys Gly Val Phe Tyr Met Pro Gly Val Met  
100 105 110

Thr Pro Thr Glu Leu Val Lys Ala Met Lys Leu Gly His Thr Ile Leu  
115 120 125

Lys Leu Phe Pro Gly Glu Val Val Gly Pro Gln Phe Val Lys Ala Met  
130 135 140

Lys Gly Pro Phe Pro Asn Val Lys Phe Val Pro Thr Gly Gly Val Asn

145 150 155 160

Leu Asp Asn Val Cys Glu Trp Phe Lys Ala Gly Val Leu Ala Val Gly  
165 170 175

Val Gly Ser Ala Leu Val Lys Gly Thr Trp Asp Glu Val Ser Arg Lys  
180 185 190

Ala Lys Ala Phe Val Glu Lys Ile Arg Gly Cys Thr Glu  
195 200 205

<210> 9

<211> 205

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列(Synthetic sequence)

<400> 9

Met Lys Met Glu Glu Leu Phe Lys Lys His Lys Ile Val Ala Val Leu  
1 5 10 15

[0006] Arg Ala Asn Ser Val Glu Glu Ala Lys Trp Lys Ala Leu His Val Phe  
20 25 30

Thr Gly Gly Val His Leu Ile Glu Ile Thr Phe Thr Val Pro Asp Ala  
35 40 45

Asp Thr Val Ile Lys Glu Leu Ser Phe Leu Lys Glu Gln Gly Ala Ile  
50 55 60

Ile Gly Ala Gly Thr Val Thr Ser Val Glu Gln Cys Arg Lys Ala Val  
65 70 75 80

Glu Ser Gly Ala Glu Phe Ile Val Ser Pro His Leu Asp Glu Glu Ile  
85 90 95

Ser Gln Phe Cys Lys Glu Lys Gly Val Phe Tyr Met Pro Gly Val Met  
100 105 110

Thr Pro Thr Glu Leu Val Lys Ala Met Lys Leu Gly His Thr Ile Leu  
115 120 125

Lys Leu Phe Pro Gly Glu Val Val Gly Pro Gln Phe Val Lys Ala Met  
130 135 140

Lys Gly Pro Phe Pro Asn Val Lys Phe Val Pro Thr Gly Gly Val Asn  
145 150 155 160

Leu Asp Asn Val Cys Glu Trp Phe Lys Ala Gly Val Leu Ala Val Gly  
165 170 175

Val Gly Ser Ala Leu Val Lys Gly Thr Trp His Glu Val Ala Ala Lys  
180 185 190

Ala Lys Ala Phe Val Glu Lys Ile Arg Gly Cys Thr Glu  
195 200 205

<210> 10

<211> 205

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列(Synthetic sequence)

<400> 10

Met Lys Met Glu Glu Leu Phe Lys Lys His Lys Ile Val Ala Val Leu  
1 5 10 15

[0007]

Arg Ala Asn Ser Val Glu Glu Ala Lys Met Lys Ala Leu His Val Phe  
20 25 30

Thr Gly Gly Val His Leu Ile Glu Ile Thr Phe Thr Val Pro Asp Ala  
35 40 45

Asp Thr Val Ile Lys Glu Leu Ser Phe Leu Lys Glu Trp Gly Ala Ile  
50 55 60

Ile Gly Ala Gly Thr Val Thr Ser Val Glu Gln Cys Arg Lys Ala Val  
65 70 75 80

Glu Ser Gly Ala Glu Phe Ile Val Ser Pro His Leu Asp Glu Glu Ile  
85 90 95

Ser Gln Phe Cys Lys Glu Lys Gly Val Phe Tyr Met Pro Gly Val Met  
100 105 110

Thr Pro Thr Glu Leu Val Lys Ala Met Lys Leu Gly His Thr Ile Leu  
115 120 125

Lys Leu Phe Pro Gly Glu Val Val Gly Pro Gln Phe Val Lys Ala Met  
130 135 140

Lys Gly Pro Phe Pro Asn Val Lys Phe Val Pro Thr Gly Gly Val Asn  
145 150 155 160

Leu Asp Asn Val Cys Glu Trp Phe Lys Ala Gly Val Leu Ala Val Gly  
165 170 175

Val Gly Ser Ala Leu Val Lys Gly Thr Trp Asp Glu Val Ala Ala Lys  
180 185 190

Ala Lys Ala Phe Val Glu Lys Ile Arg Gly Cys Thr Glu  
195 200 205

<210> 11  
<211> 205  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成序列(Synthetic sequence)

<400> 11

Met Lys Met Glu Glu Leu Phe Lys Lys His Lys Ile Val Ala Val Leu  
1 5 10 15

[0008]

Arg Ala Asn Ser Val Glu Glu Ala Lys Lys Lys Ala Leu Ala Val Phe  
20 25 30

Leu Ala Gly Val His Leu Ile Glu Ile Thr Phe Thr Val Pro Asp Ala  
35 40 45

Asp Thr Val Ile Lys Glu Leu Ser Phe Leu Lys Glu Met Gly Ala Ile  
50 55 60

Ile Gly Ala Gly Thr Val Thr Ser Val Glu Gln Cys Arg Lys Ala Val  
65 70 75 80

Glu Ser Gly Ala Glu Phe Ile Val Ser Pro His Leu Asp Glu Glu Ile  
85 90 95

Ser Gln Phe Cys Lys Glu Lys Gly Val Phe Tyr Met Pro Gly Val Met  
100 105 110

Thr Pro Thr Glu Leu Val Lys Ala Met Lys Leu Gly His Thr Ile Leu  
115 120 125

Lys Leu Phe Pro Gly Glu Val Val Gly Pro Gln Phe Val Lys Ala Met  
130 135 140

Lys Gly Pro Phe Pro Asn Val Lys Phe Val Pro Thr Gly Gly Val Asn  
145 150 155 160

Leu Asp Asn Val Cys Glu Trp Phe Lys Ala Gly Val Leu Ala Val Gly  
165 170 175

Val Gly Ser Ala Leu Val Lys Gly Thr Val Val Glu Val Ala Ala Lys  
180 185 190

Ala Ala Ala Phe Val Glu Lys Ile Arg Gly Cys Thr Glu  
195 200 205

<210> 12

<211> 205

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列(Synthetic sequence)

<400> 12

Met Lys Met Glu Glu Leu Phe Lys Lys His Lys Ile Val Ala Val Leu  
1 5 10 15

[0009]

Arg Ala Asn Ser Val Glu Glu Ala Lys Lys Lys Ala Leu Ala Val Phe  
20 25 30

Leu Gly Gly Val His Leu Ile Glu Ile Thr Phe Thr Val Pro Asp Ala  
35 40 45

Asp Thr Val Ile Lys Glu Leu Ser Phe Leu Lys Glu Met Gly Ala Ile  
50 55 60

Ile Gly Ala Gly Thr Val Thr Ser Val Glu Gln Cys Arg Lys Ala Val  
65 70 75 80

Glu Ser Gly Ala Glu Phe Ile Val Ser Pro His Leu Asp Glu Glu Ile  
85 90 95

Ser Gln Phe Cys Lys Glu Lys Gly Val Phe Tyr Met Pro Gly Val Met  
100 105 110

Thr Pro Thr Glu Leu Val Lys Ala Met Lys Leu Gly His Thr Ile Leu  
115 120 125

Lys Leu Phe Pro Gly Glu Val Val Gly Pro Gln Phe Val Lys Ala Met

	130	135	140	
	Lys Gly Pro Phe Pro Asn Val Lys Phe Val Pro Thr Gly Gly Val Asn 145 150 155 160			
	Leu Asp Asn Val Cys Glu Trp Phe Lys Ala Gly Val Leu Ala Val Gly 165 170 175			
	Val Gly Ser Ala Leu Val Lys Gly Thr Ile Val Glu Val Ala Ala Lys 180 185 190			
	Ala Ala Ala Phe Val Glu Lys Ile Arg Gly Cys Thr Glu 195 200 205			
	<210> 13			
	<211> 205			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
	<220>			
	<223> 合成序列(Synthetic sequence)			
	<400> 13			
[0010]	Met Lys Met Glu Glu Leu Phe Lys Lys His Lys Ile Val Ala Val Leu 1 5 10 15			
	Arg Ala Asn Ser Val Glu Glu Ala Lys Lys Lys Ala Leu Ala Val Phe 20 25 30			
	Leu Gly Gly Val His Leu Ile Glu Ile Thr Phe Thr Val Pro Asp Ala 35 40 45			
	Asp Thr Val Ile Lys Glu Leu Ser Phe Leu Lys Glu Met Gly Ala Ile 50 55 60			
	Ile Gly Ala Gly Thr Val Thr Ser Val Glu Gln Cys Arg Lys Ala Val 65 70 75 80			
	Glu Ser Gly Ala Glu Phe Ile Val Ser Pro His Leu Asp Glu Glu Ile 85 90 95			
	Ser Gln Phe Cys Lys Glu Lys Gly Val Phe Tyr Met Pro Gly Val Met 100 105 110			
	Thr Pro Thr Glu Leu Val Lys Ala Met Lys Leu Gly His Thr Ile Leu 115 120 125			

Lys Leu Phe Pro Gly Glu Val Val Gly Pro Gln Phe Val Lys Ala Met  
130 135 140

Lys Gly Pro Phe Pro Asn Val Lys Phe Val Pro Thr Gly Gly Val Asn  
145 150 155 160

Leu Asp Asn Val Cys Glu Trp Phe Lys Ala Gly Val Leu Ala Val Gly  
165 170 175

Val Gly Ser Ala Leu Val Lys Gly Thr Trp Val Glu Val Ala Ala Lys  
180 185 190

Ala Ala Ala Phe Val Glu Lys Ile Arg Gly Cys Thr Glu  
195 200 205

<210> 14

<211> 205

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列(Synthetic sequence)

<400> 14

[0011]

Met Lys Met Glu Glu Leu Phe Lys Lys His Lys Ile Val Ala Val Leu  
1 5 10 15

Arg Ala Asn Ser Val Glu Glu Ala Lys Met Lys Ala Leu Gln Val Phe  
20 25 30

Val Gly Gly Val His Leu Ile Glu Ile Thr Phe Thr Val Pro Asp Ala  
35 40 45

Asp Thr Val Ile Lys Glu Leu Ser Phe Leu Lys Glu Ala Gly Ala Ile  
50 55 60

Ile Gly Ala Gly Thr Val Thr Ser Val Glu Gln Cys Arg Lys Ala Val  
65 70 75 80

Glu Ser Gly Ala Glu Phe Ile Val Ser Pro His Leu Asp Glu Glu Ile  
85 90 95

Ser Gln Phe Cys Lys Glu Lys Gly Val Phe Tyr Met Pro Gly Val Met  
100 105 110

Thr Pro Thr Glu Leu Val Lys Ala Met Lys Leu Gly His Thr Ile Leu  
115 120 125

Lys Leu Phe Pro Gly Glu Val Val Gly Pro Gln Phe Val Lys Ala Met  
130 135 140

Lys Gly Pro Phe Pro Asn Val Lys Phe Val Pro Thr Gly Gly Val Asn  
145 150 155 160

Leu Asp Asn Val Cys Glu Trp Phe Lys Ala Gly Val Leu Ala Val Gly  
165 170 175

Val Gly Ser Ala Leu Val Lys Gly Thr Leu Ala Glu Val Ala Ala Lys  
180 185 190

Ala Glu Ala Phe Val Glu Lys Ile Arg Gly Cys Thr Glu  
195 200 205

<210> 15  
<211> 205  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成序列(Synthetic sequence)

<400> 15

[0012]

Met Lys Met Glu Glu Leu Phe Lys Lys His Lys Ile Val Ala Val Leu  
1 5 10 15

Arg Ala Asn Ser Val Glu Glu Ala Lys Trp Lys Ala Leu His Val Phe  
20 25 30

Val Gly Gly Val His Leu Ile Glu Ile Thr Phe Thr Val Pro Asp Ala  
35 40 45

Asp Thr Val Ile Lys Glu Leu Ser Phe Leu Lys Glu Ala Gly Ala Ile  
50 55 60

Ile Gly Ala Gly Thr Val Thr Ser Val Glu Gln Cys Arg Lys Ala Val  
65 70 75 80

Glu Ser Gly Ala Glu Phe Ile Val Ser Pro His Leu Asp Glu Glu Ile  
85 90 95

Ser Gln Phe Cys Lys Glu Lys Gly Val Phe Tyr Met Pro Gly Val Met  
100 105 110

Thr Pro Thr Glu Leu Val Lys Ala Met Lys Leu Gly His Thr Ile Leu  
115 120 125



Lys Leu Phe Pro Gly Glu Val Val Gly Pro Gln Phe Val Lys Ala Met  
130 135 140

Lys Gly Pro Phe Pro Asn Val Lys Phe Val Pro Thr Gly Gly Val Asn  
145 150 155 160

Leu Asp Asn Val Cys Glu Trp Phe Lys Ala Gly Val Leu Ala Val Gly  
165 170 175

Val Gly Ser Ala Leu Val Lys Gly Thr Trp Ala Glu Val Ala Ala Lys  
180 185 190

Ala Lys Ala Phe Val Glu Lys Ile Arg Gly Cys Thr Glu  
195 200 205

<210> 16  
<211> 205  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成序列(Synthetic sequence)

<400> 16

[0013]

Met Lys Met Glu Glu Leu Phe Lys Lys His Lys Ile Val Ala Val Leu  
1 5 10 15

Arg Ala Asn Ser Val Glu Glu Ala Lys Met Lys Ala Leu Ala Val Phe  
20 25 30

Val Gly Gly Val His Leu Ile Glu Ile Thr Phe Thr Val Pro Asp Ala  
35 40 45

Asp Thr Val Ile Lys Glu Leu Ser Phe Leu Lys Glu Leu Gly Ala Ile  
50 55 60

Ile Gly Ala Gly Thr Val Thr Ser Val Glu Gln Cys Arg Lys Ala Val  
65 70 75 80

Glu Ser Gly Ala Glu Phe Ile Val Ser Pro His Leu Asp Glu Glu Ile  
85 90 95

Ser Gln Phe Cys Lys Glu Lys Gly Val Phe Tyr Met Pro Gly Val Met  
100 105 110

Thr Pro Thr Glu Leu Val Lys Ala Met Lys Leu Gly His Thr Ile Leu

	115	120	125
	Lys Leu Phe Pro Gly Glu Val Val Gly Pro Gln Phe Val Lys Ala Met 130 135 140		
	Lys Gly Pro Phe Pro Asn Val Lys Phe Val Pro Thr Gly Gly Val Asn 145 150 155 160		
	Leu Asp Asn Val Cys Glu Trp Phe Lys Ala Gly Val Leu Ala Val Gly 165 170 175		
	Val Gly Ser Ala Leu Val Lys Gly Thr Ile Ala Glu Val Ala Ala Lys 180 185 190		
	Ala Ala Ala Phe Val Glu Lys Ile Arg Gly Cys Thr Glu 195 200 205		
	<210> 17		
	<211> 205		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
	<220>		
[0014]	<223> 合成序列(Synthetic sequence)		
	<400> 17		
	Met Lys Met Glu Glu Leu Phe Lys Lys His Lys Ile Val Ala Val Leu 1 5 10 15		
	Arg Ala Asn Ser Val Glu Glu Ala Lys Met Lys Ala Leu Ala Val Phe 20 25 30		
	Tyr Gly Gly Val His Leu Ile Glu Ile Thr Phe Thr Val Pro Asp Ala 35 40 45		
	Asp Thr Val Ile Lys Glu Leu Ser Phe Leu Lys Glu Ala Gly Ala Ile 50 55 60		
	Ile Gly Ala Gly Thr Val Thr Ser Val Glu Gln Cys Arg Lys Ala Val 65 70 75 80		
	Glu Ser Gly Ala Glu Phe Ile Val Ser Pro His Leu Asp Glu Glu Ile 85 90 95		
	Ser Gln Phe Cys Lys Glu Lys Gly Val Phe Tyr Met Pro Gly Val Met 100 105 110		

Thr Pro Thr Glu Leu Val Lys Ala Met Lys Leu Gly His Thr Ile Leu  
115 120 125

Lys Leu Phe Pro Gly Glu Val Val Gly Pro Gln Phe Val Lys Ala Met  
130 135 140

Lys Gly Pro Phe Pro Asn Val Lys Phe Val Pro Thr Gly Gly Val Asn  
145 150 155 160

Leu Asp Asn Val Cys Glu Trp Phe Lys Ala Gly Val Leu Ala Val Gly  
165 170 175

Val Gly Ser Ala Leu Val Lys Gly Thr Phe Val Glu Val Ala Ala Lys  
180 185 190

Ala Ala Ala Phe Val Glu Lys Ile Arg Gly Cys Thr Glu  
195 200 205

<210> 18  
<211> 224  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0015] <220>  
<223> 合成序列(Synthetic sequence)

<400> 18

Met His His His His His His Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser  
1 5 10 15

Gly Gly Ser Met Lys Met Glu Glu Leu Phe Lys Lys His Lys Ile Val  
20 25 30

Ala Val Leu Arg Ala Asn Ser Val Glu Glu Ala Lys Lys Lys Ala Leu  
35 40 45

Ala Val Phe Leu Gly Gly Val His Leu Ile Glu Ile Thr Phe Thr Val  
50 55 60

Pro Asp Ala Asp Thr Val Ile Lys Glu Leu Ser Phe Leu Lys Glu Met  
65 70 75 80

Gly Ala Ile Ile Gly Ala Gly Thr Val Thr Ser Val Glu Gln Cys Arg  
85 90 95

Lys Ala Val Glu Ser Gly Ala Glu Phe Ile Val Ser Pro His Leu Asp  
100 105 110

Glu Glu Ile Ser Gln Phe Cys Lys Glu Lys Gly Val Phe Tyr Met Pro  
115 120 125

Gly Val Met Thr Pro Thr Glu Leu Val Lys Ala Met Lys Leu Gly His  
130 135 140

Thr Ile Leu Lys Leu Phe Pro Gly Glu Val Val Gly Pro Gln Phe Val  
145 150 155 160

Lys Ala Met Lys Gly Pro Phe Pro Asn Val Lys Phe Val Pro Thr Gly  
165 170 175

Gly Val Asn Leu Asp Asn Val Cys Glu Trp Phe Lys Ala Gly Val Leu  
180 185 190

Ala Val Gly Val Gly Ser Ala Leu Val Lys Gly Thr Pro Val Glu Val  
195 200 205

Ala Glu Lys Ala Lys Ala Phe Val Glu Lys Ile Arg Gly Cys Thr Glu  
210 215 220

[0016]

<210> 19  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成序列(Synthetic sequence)

<400> 19

Gly Ser Gly Ser Gly  
1 5

<210> 20  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成序列(Synthetic sequence)

<400> 20

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10

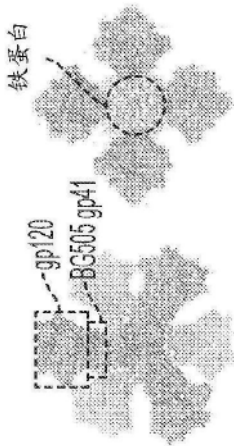


图1A

UFO2-BG-FR	
(1)	进化枝 A: BG505
(2)	进化枝 A: Q842-d12
(3)	进化枝 B: 6240.08.TA5.4622
(4)	进化枝 B: H078.14
(5)	进化枝 C: Du172.17
(6)	进化枝 C: 16055-2.3
(7)	进化枝 B'/C: CH115.12
(8)	进化枝 A/E: 93JP_NH1

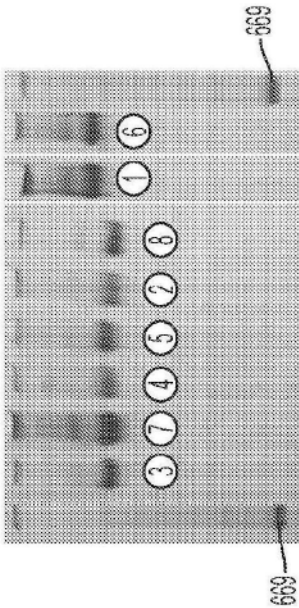


图1B

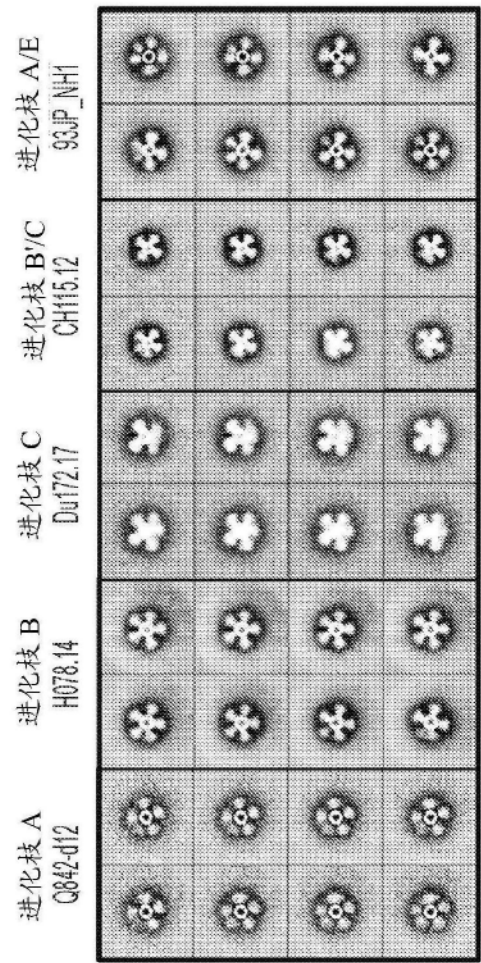


图1C

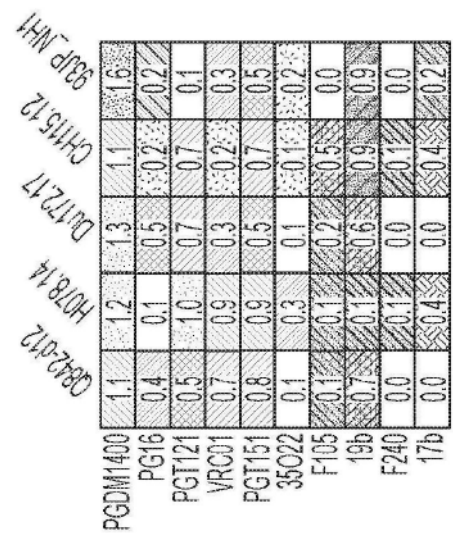


图1D

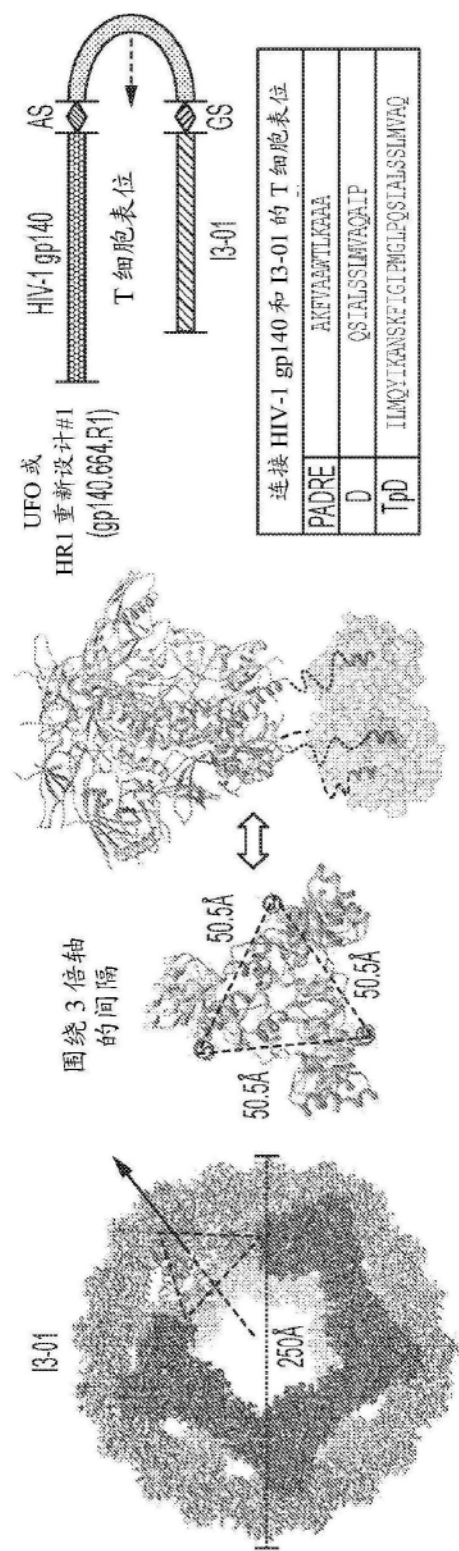


图1E

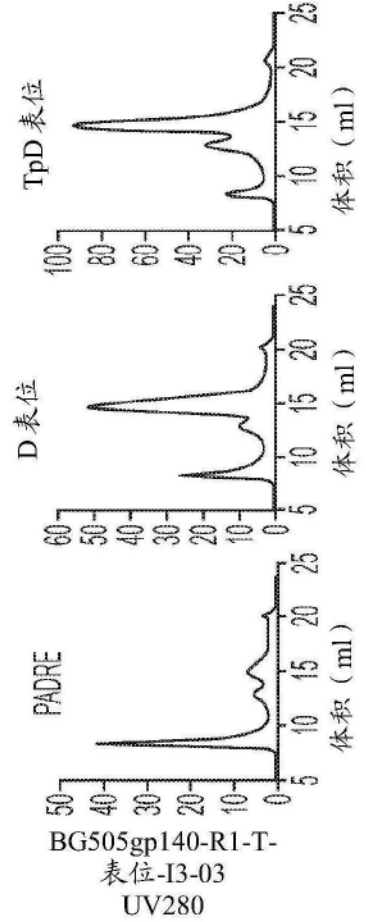


图1F

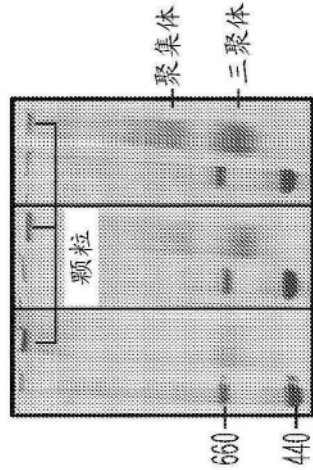


图1G



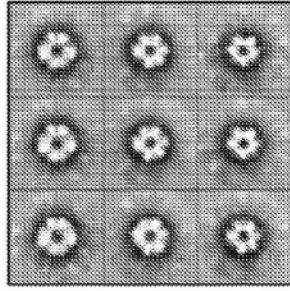


图1H

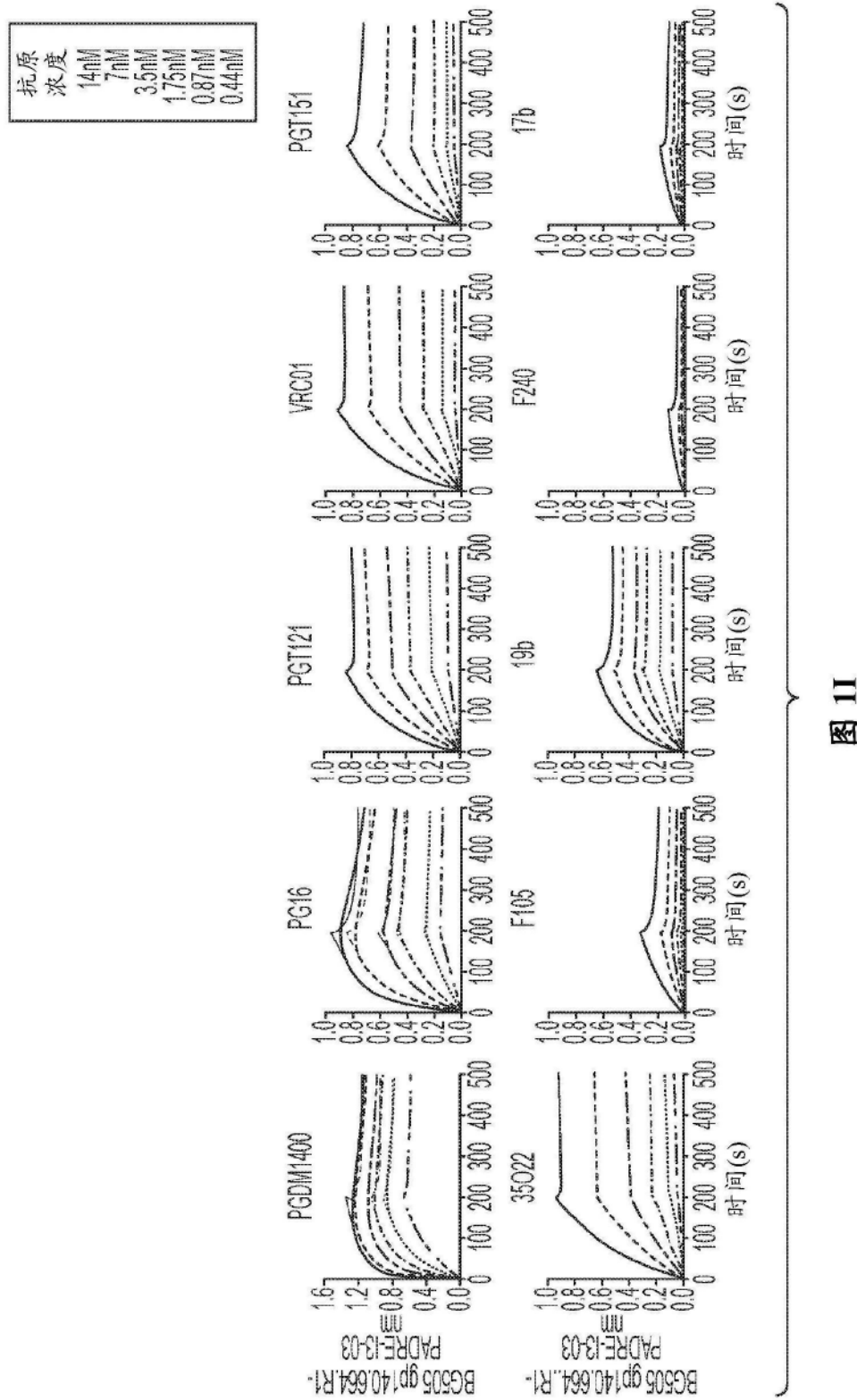


图 11

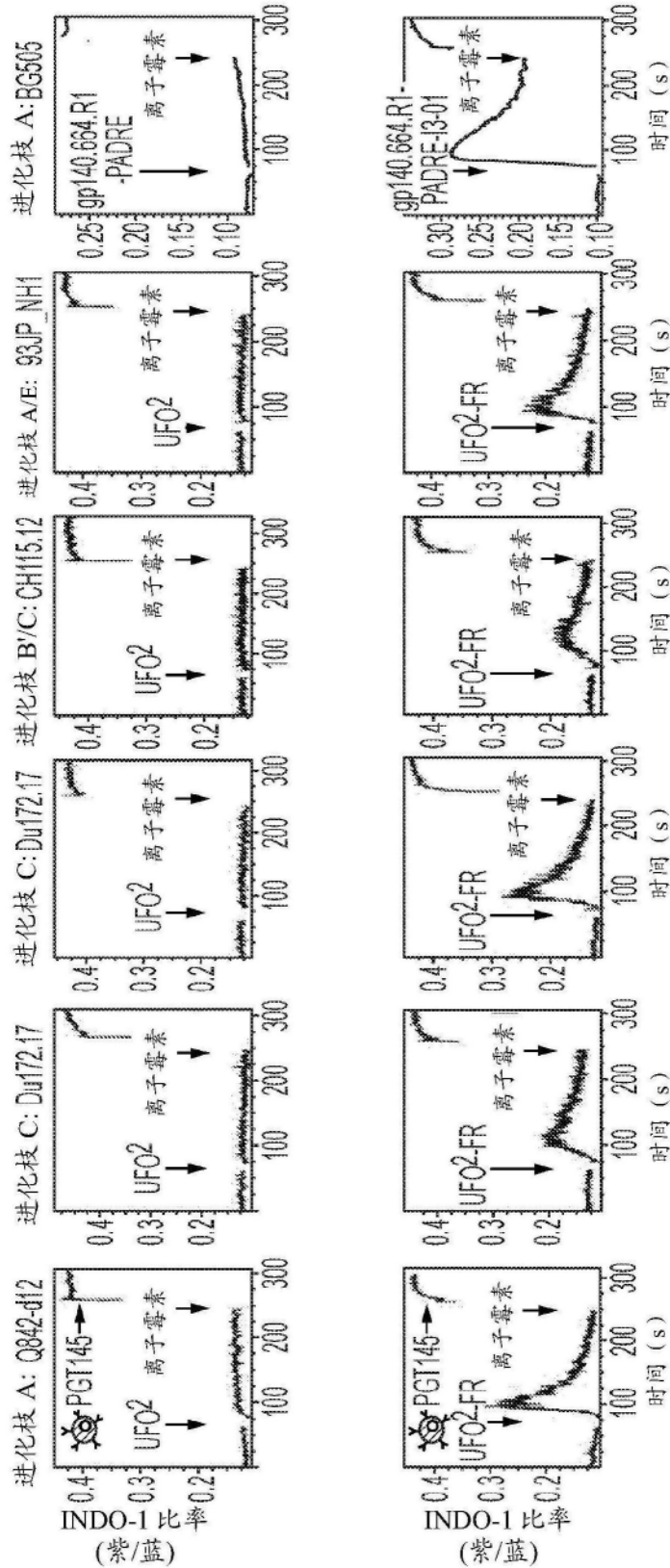


图2A

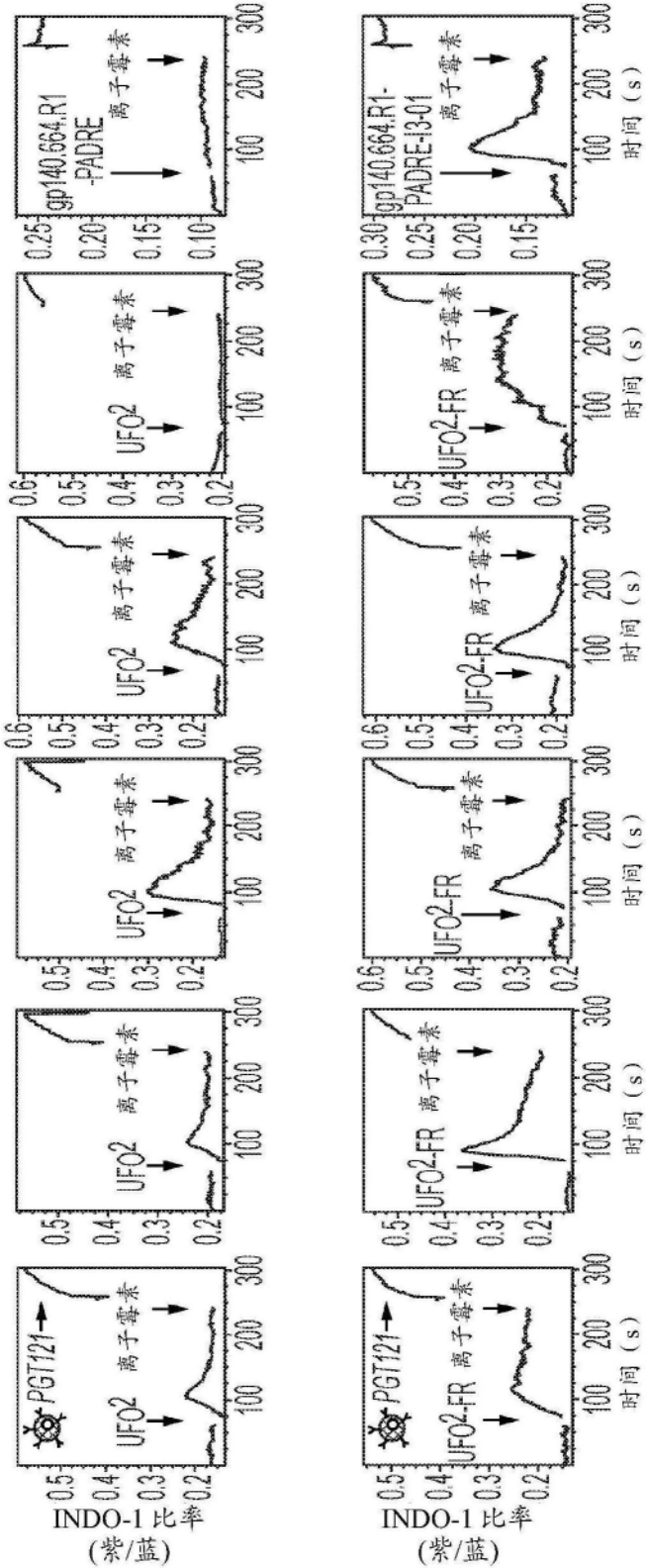


图2B

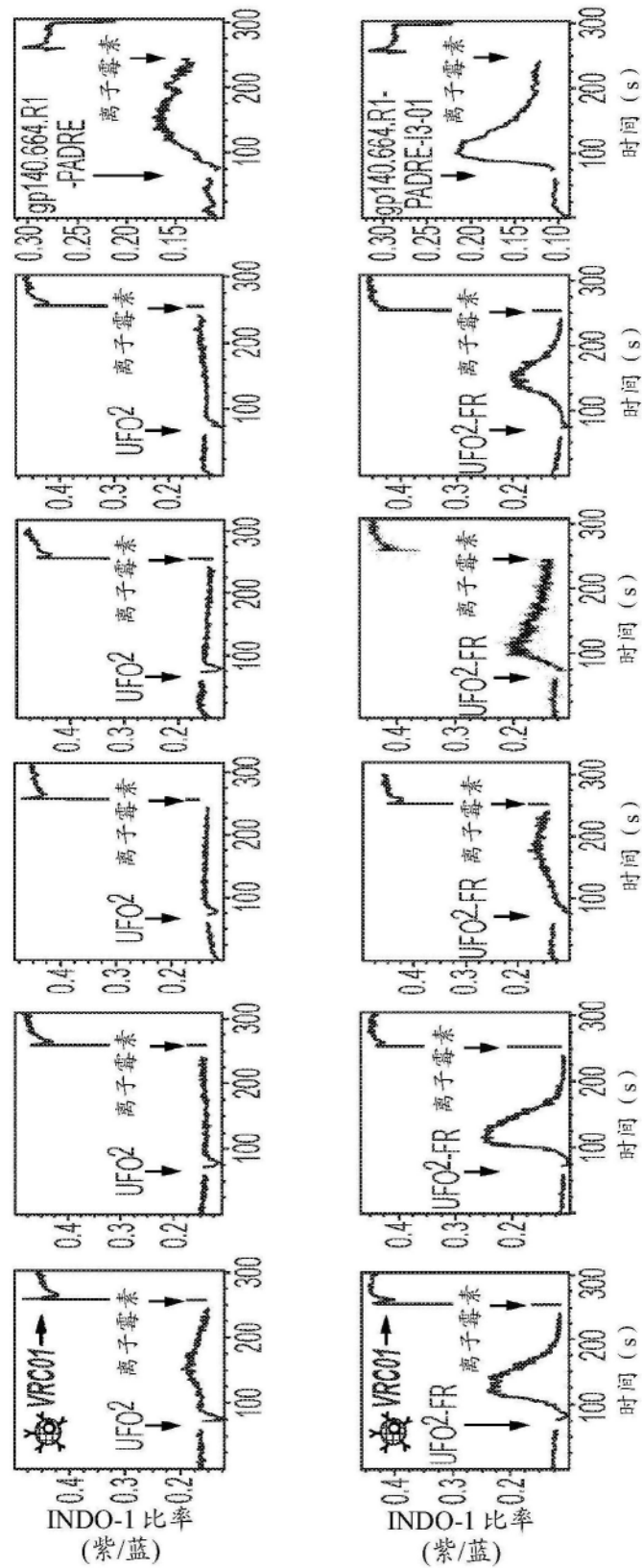


图2C

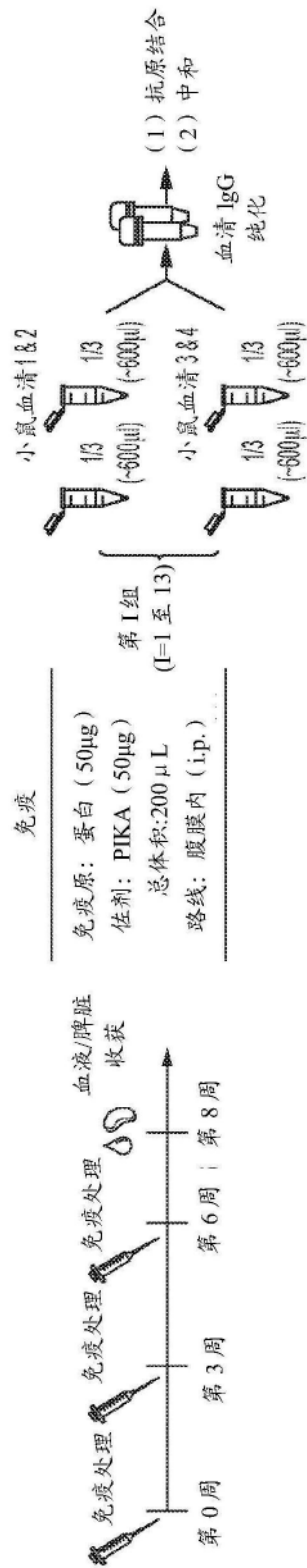


图3A

BG505 三聚体和纳米颗粒免疫原组<sup>a</sup>

S1G3: gp 140.664.R1 (293 F)	S1G4: gp 140.664.R1 (CHO)	S1G5: gp 140.664.R1-1N0G (293 F)	S1G7: gp 140.664.R1-1F0H (293 F)	S2G5: gp 140.664.R1-PADRE-13-01 (CHO)
S1G1: gp 140.664.R1-铁蛋白 (CHO)	S1G8: gp 140.664.R1-父 (CHO)	S1G9: gp 140.664.R1-D (CHO)	S1G10: gp 140.664.R1-TpD (CHO)	
S1G6: gp 140.664.R1-D-13-01 (CHO)	S2G7: gp 140.664.R1-TpD-13-01 (CHO)	S1G0: 未免疫处理的		
		三聚体		
		纳米颗粒		

R1 代表 HR1 重新设计 1，其中 gp140 是未裂解的 (gp140.664.R1)，表达系统 293F 或者 CHO 在括号中表示

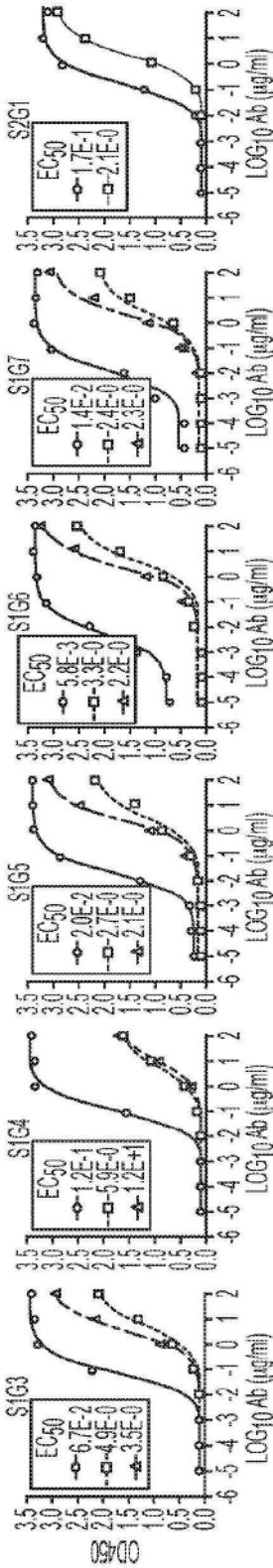


图3B

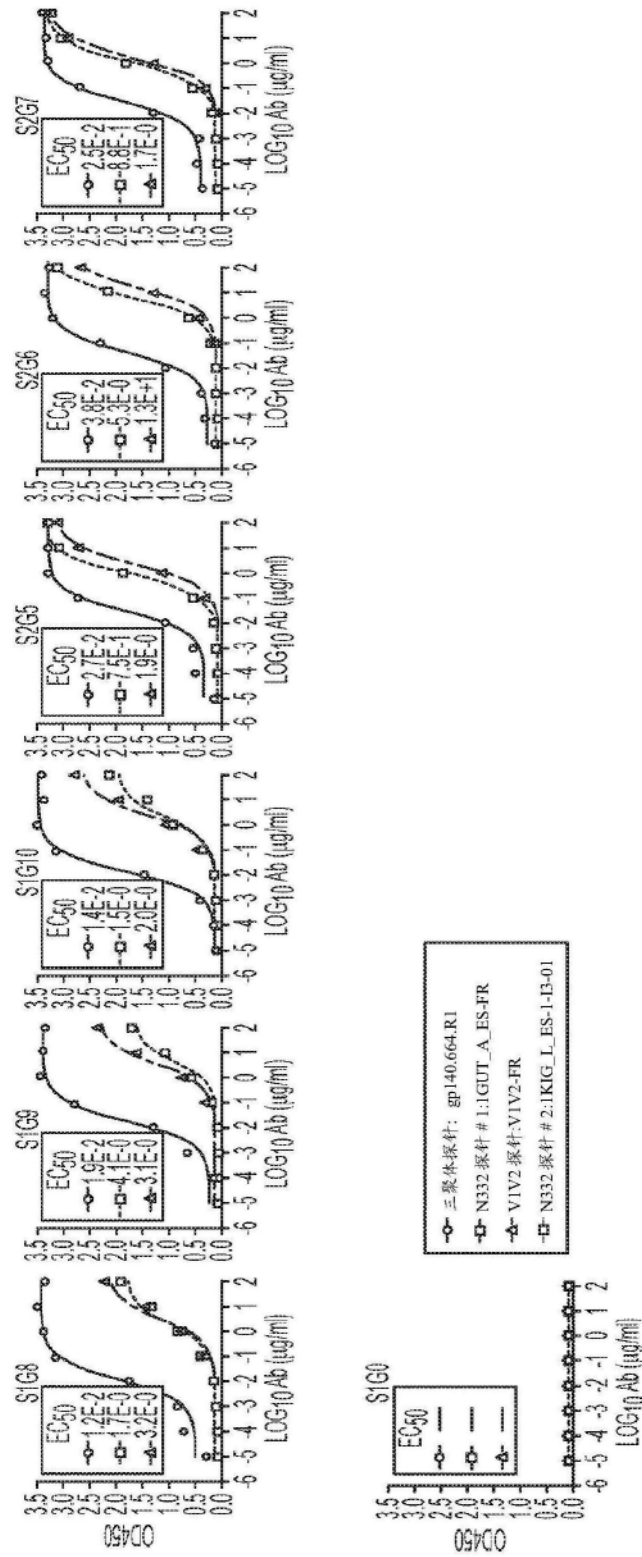


图3B继续



小鼠血清 IgG 的组合组的 HIV-1 中和 (IC50, 1:X)

	S1G3	S1G4	S1G5	S1G6	S1G7
TIER-2 进化枝-A BG505.N332	<80	<80	91	<80	<80
TIER-1 进化枝-B SF162	231	222	65	141	905
MLV(对照)	<80	<80	<80	<80	<80
	S2G1	S1G8	S1G9	S1G10	S2G5
TIER-2 进化枝-A BG505.N332	248	<80	<80	<80	247
TIER-1 进化枝-B SF162	297	192	108	<80	376
MLV(对照)	<80	<80	<80	<80	<80
	S2G6	S2G7	S1G0		
TIER-2 进化枝-A BG505.N332	137	<80	<80		
TIER-1 进化枝-B SF162	396	229	<80		
MLV(对照)	<80	<80	<80		

图3C

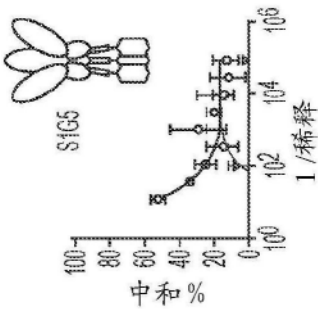


图3D

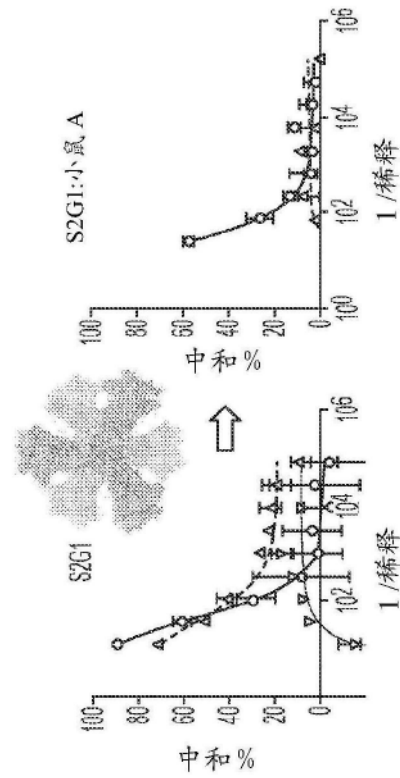


图3E

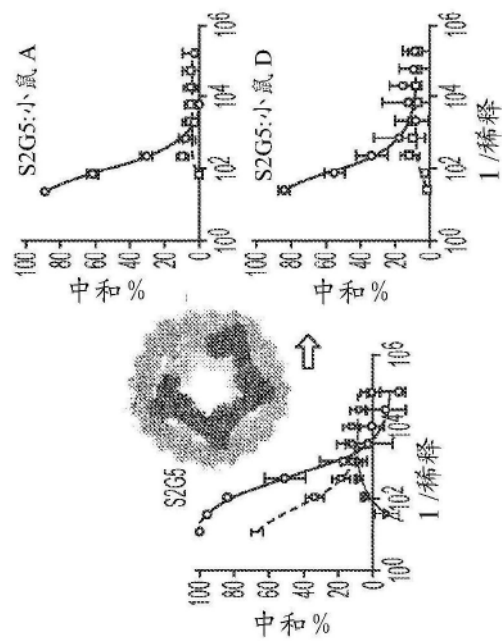


图3F

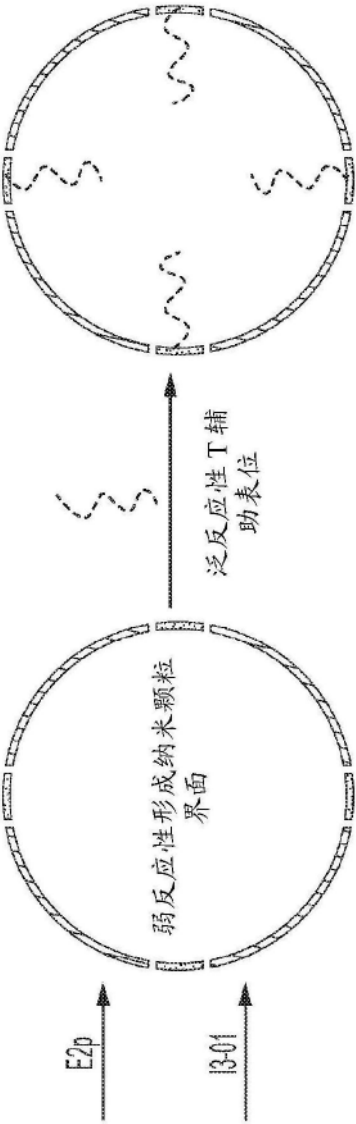


图4A

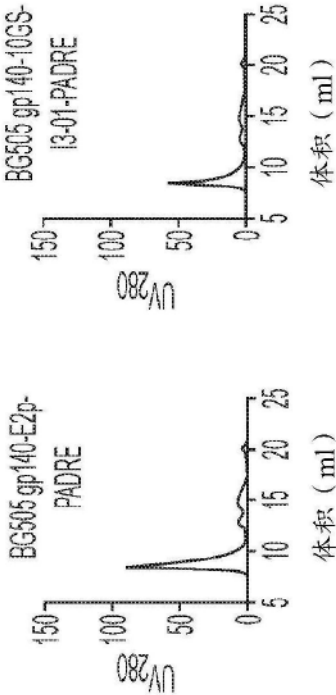


图4B

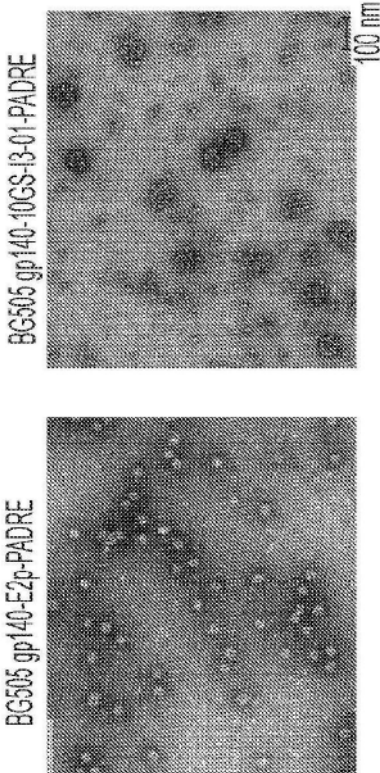


图4C