(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201691631 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.01.30

(22) Дата подачи заявки
2015.02.13

(51) Int. Cl. ***A61K 39/00*** (2006.01)

(54) ИММУНОТЕРАПИЯ РАКА С ПРИМЕНЕНИЕМ КОМБИНАЦИИ МЕСТНОЙ И СИСТЕМНОЙ ИММУННОЙ СТИМУЛЯЦИИ

(31) **61/940,109; 61/985,787; 62/022,070; 62/072,548; 62/101,335**
(32) **2014.02.14; 2014.04.29; 2014.07.08; 2014.10.30; 2015.01.08**
(33) **US**
(86) **PCT/US2015/015767**
(87) **WO 2015/123496 2015.08.20**

(71) Заявитель:
ИММЬЮН ДИЗАЙН КОРП. (US)

(72) Изобретатель:
Тер Мелен Ян Хенрик, Пайя Куэнка Карлос В. (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении предлагаются композиции и способы иммунотерапии раковых заболеваний, причем в указанных способах комбинируется системная вакцинация рекомбинантным экспрессионным вектором, кодирующим вирусный антиген и/или опухолевый(е) антиген(ы), специфический(е) к раку, с целью индуцирования активированных CD8 Т-клеток путем местной (например, внутриопухолевой) стимуляции иммунной системы с использованием стандартного или модифицированного применения агониста TLR для индуцирования местных воспалительных и врожденных иммунных ответов, которые вовлекают Т-клетки в опухоль.

201691631 A1

201691631 A1

ИММУНОТЕРАПИЯ РАКА С ПРИМЕНЕНИЕМ КОМБИНАЦИИ МЕСТНОЙ И СИСТЕМНОЙ ИММУННОЙ СТИМУЛЯЦИИ

ЗАЯВЛЕНИЕ В ОТНОШЕНИИ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0001] Перечень последовательностей, связанных с реализацией настоящего изобретения, предоставлен в текстовом формате вместо бумажной копии и настоящим включен в качестве ссылки в спецификацию. Имя текстового файла, содержащего перечень последовательностей,- 48357_SeqListing.txt. Текстовый файл, содержащий 160324 байт, был создан 12 февраля 2015 года и представляется в электронном виде через EFS-Web.

Уровень техники

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение в целом относится к способам усиления иммунотерапии рака с использованием комбинации местной и системной иммунной стимуляции.

ОПИСАНИЕ ПРЕДШЕСТВУЮЩЕГО УРОВНЯ ТЕХНИКИ

[0003] Иммунная система хозяина обеспечивает возможности для быстрого и специфического формирования ответа на патогенные микроорганизмы, а также для содействия отторжению злокачественных опухолей. Иммунные реакции были описаны в целом как включающие гуморальные ответы, в которых антитела, специфичные в отношении антигенов, продуцируются дифференцированными В-лимфоцитами, и клеточно-опосредованные ответы, в которых различные типы Т-лимфоцитов устраняют антигены с помощью различных механизмов. Например, Т-хелперы CD4 (также называемые CD4+), которые способны распознавать специфические антигены, могут реагировать путем высвобождения растворимых медиаторов, таких как цитокины, с целью вовлечения дополнительных клеток иммунной системы для участия в иммунном ответе. Цитотоксические Т-клетки CD8 (называемые также CD8+) также способны распознавать специфические антигены и могут связываться с антиген-несущими клетками или частицами, уничтожить или повредить их. В частности, клеточно-опосредованные иммунные ответы, которые включают цитотоксический Т-лимфоцитарный (CTL) ответ, могут быть важны для элиминации

опухолевых клеток и клеток, инфицированных вирусом.

[0004] Рак включает широкий спектр заболеваний и поражает приблизительно одного из четырех человек во всем мире. CTL-ответ является ключевым элементом эффективных противораковых вакцин; эффективность Т-хелперов CD4 также может играть решающую роль в продуктивной активации Т-клеток CD8 и обеспечить клинический эффект. Вакцина Sipuleucel-T (PROVENGE®) на основе аутологичных дендритных клеток (DC) недавно была одобрена FDA для лечения метастатического, кастрационно-резистентного рака предстательной железы, хотя преимущество в выживаемости, связанное с этим методом лечения, является скромным - 4,1 месяца, что обуславливает значительную необходимость оптимизации этого метода (см., например, Kantoff, et al., New Engl. J. Med. 363(5):411 (2010)). Вакцина ProstVac® VF на основе вектора поксвируса также демонстрирует значительное увеличение выживаемости в фазе II (см., например, Kantoff, et al., J. Clin. Oncol. 28(7):1099 (2010)). Активные иммунные методы лечения, такие как Sipuleucel-T и ProstVac® VF, как правило, лучше переносятся, чем химиотерапевтические препараты, которые включены в действующий протокол лечения кастрационно-резистентного рака (см., например, Petrylak, et al., N. Engl. J. Med. 351(15):1513 (2004); Sylwester, et al., J. Exp. Med. 202(5):673 (2005)). Эти клинические успехи демонстрируют, что иммунный ответ может использоваться при раке с целью обеспечения лучших результатов лечения пациентов и продления выживания.

[0005] Многие чужеродные (то есть "не свои") антигены являются слабо иммуногенными и требуют введения адъюванта для обеспечения удовлетворительного иммунного ответа на антиген. Адъюванты также могут использоваться с целью смещения иммунного ответа к гуморальному ответу или клеточно-опосредованному ответу, а также некоторые адъюванты также могут использоваться с целью смещения ответа антитела к конкретному изотипу антитела или смещения клеточного ответа к конкретному подмножеству Т-клеток. Выбор адъюванта и/или способ доставки адъюванта для индуцирования или усиления иммунного ответа на иммуногены могут

быть важными аспектами разработки вакцины для терапевтических и профилактических целей.

[0006] После хирургического лечения и в зависимости от стадии рак мочевого пузыря без прорастания в мышечный слой (NMIBC) можно контролировать с помощью иммунотерапии с использованием вакцины с бациллой Кальметта-Герена (БЦЖ), вводимой неоднократно в мочевой пузырь, как правило, шестинедельным курсом с последующей ежегодной поддерживающей терапией. Применение вакцины БЦЖ в этом контексте является первой линией терапии и обычно рассматривается как самый старый и на сегодняшний день самый успешный способ иммунотерапии рака (Gandh, N.M., et. al., BJU Int., Aug;112(3):288-97 (2013)).

[0007] Противоопухолевое действие БЦЖ до конца не изучено, но включает инфицирование уротелиальных или раковых клеток мочевого пузыря и индукцию как неспецифических воспалительных, так и специфических противоопухолевых реакций (Kawai, et al., Cancer Sci., Jan;104(1):22-7 (2013)). Подмножества клеток иммунной системы, которые имеют потенциальные функции при БЦЖ-терапии, включают лимфоциты CD4+ и CD8+, естественные клетки-киллеры, гранулоциты, макрофаги и дендритные клетки. Клетки рака мочевого пузыря погибают посредством прямой цитотоксичности этих клеток, путем секреции растворимых факторов, таких как TRAIL (родственный фактору некроза опухоли апоптоз-индуцирующий лиганд) и, в некоторой степени, с помощью прямого действия БЦЖ (Redelman-Sidi G., et al., Nat Rev Urol., Feb 4. [Онлайн публикация до выхода печатной версии] (2014)). Следует отметить, что в данном контексте, например, при применении БЦЖ в лечении рака мочевого пузыря, БЦЖ функционирует в качестве агониста TLR. В частности, TLR2 и TLR4 по всей видимости регулируют различные аспекты иммунного ответа хозяина против БЦЖ (см. J Leukoc Biol. 2003;74:277-86).

[0008] Существенным недостатком применяемого лечения с БЦЖ является отсутствие ответа у значительного числа пациентов. Например, в зависимости от конечных критериев изучения, до 50% пациентов не отвечают на лечение и характеризуются прогрессированием рака до состояния с вовлечением мышечного

слоя. Кроме того, в около одной трети пациентов, которые первоначально отвечают на терапию, развивается рецидив опухоли (Sylvester, R.J., Int J Urol., Feb;18(2):113-20 (2011)). Недавнее исследование показало, что у пациентов с рецидивом после БЦЖ-терапии могут наблюдаться уротелиальная карцинома верхних мочевых путей или простатической части уретры, которые не доступны для БЦЖ (Giannarini, G., et al., Eur Urol. Oct 9.[Онлайн публикация до выхода печатной версии] 2013)). Кроме того, пациенты без измеряемого предсуществующего уровня Т-клеточного иммунитета к БЦЖ (из-за предыдущей вакцинации БЦЖ или естественного воздействия микобактерий), имеют более низкий показатель безрецидивной выживаемости (Biot, C., et al., Sci Transl Med., Jun 6;4(137):137ra72 (2012)). И, наконец, иммунотерапия с применением БЦЖ может иметь серьезные побочные эффекты в результате местной или системной инфекции, вызванной БЦЖ (Miyazaki, J., et al., Jpn J Clin Oncol., Aug;43(8):827-34 (2013)).

[0009] В настоящее время разрабатываются несколько направления исследований для оптимизации существующей БЦЖ-терапии. Например, замена классической БЦЖ на генноинженерную БЦЖ, экспрессирующую цитокины Th1-типа, или возможность повышения эффективности или уменьшения побочных эффектов благодаря нерезультативной репликации (Kawai, et al., Cancer Sci., Jan;104(1):22-7 (2013)). Другим примером может служить использование малых молекулл-агонистов толл-подобных рецепторов (TLR) для стимуляции врожденного иммунного ответа в мочевом пузыре (Falke, J., et al., J Urol., Jun;189(6):2077-82 (2013)). И, наконец, вирусные векторы (например, на основе аденовирусов) используются для того, чтобы вызвать "иммуногенную гибель клетки" в раковых клетках, индуцированных вирусом, и экспрессирования дополнительных иммуностимулирующих факторов, среди которых GM-CSF (Burke, J., Cytokine Growth Factor Rev.; 21(2-3):99-102 (2010)). Тем не менее, ни одна из вышеуказанных стратегий на сегодняшний день не вышла за пределы начальных фаз клинических исследований, и при отсутствии надлежащих доклинических моделей рака мочевого пузыря их потенциальную

эффективность предсказать трудно.

[0010] Недавние исследования показали, что рак мочевого пузыря связан с герпесвирусом, ассоциированным с саркомой Капоши (KSHV); KSHV также известный как человеческий герпесвирус 8. В частности, ДНК KSHV была обнаружена у 55% пациентов. (M. Paradžik et al., Tumor Biology, 2014, 35(1), pp 567-572). Вообще, около 12% всех раковых заболеваний человека во всем мире вызваны онкогенной вирусной инфекцией (см., например, Mesri et al., 2014, Cell Host & Microbe 15:266-282; Bouvard, V., et al. (2009). Lancet Oncol. 10, 321-322; Boyle, P., and Levin, B. (2008). World Cancer Report 2008. (Lyon: International Agency for Research on Cancer and World Health Organization Press); de Martel, C., et al., (2012). Lancet Oncol. 13, 607-615).

[0011] В настоящем изобретении предлагается иммунотерапевтическое лечение раковых заболеваний, в том числе вирус-индуцированных раков. Эти и другие преимущества приведены в настоящем описании.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0012] Настоящее изобретение относится к композициям и способам усиления иммунотерапии раковых заболеваний, среди которых вирус-индуцированный рак, с помощью комбинации местной и системной иммунной стимуляции. В одном варианте реализации настоящего изобретения предлагается способ лечения рака, включающий: a) индуцирование у субъекта иммунного ответа, специфического для иммуногена, включающее введение субъекту первой композиции, содержащей векторную частицу, причем векторная частица содержит рекомбинантный экспрессионный вектор, при этом рекомбинантный экспрессионный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий иммуноген, и при этом полинуклеотид функционально связан по меньшей мере с одной регулирующей экспрессию последовательностью; и b) местное введение субъекту второй композиции, содержащей фармацевтически приемлемый адъювант, причем вторая композиция не содержит или, по существу, лишена иммуногена, при этом как первая композиция, так и вторая композиция дополнительно содержат фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, и причем первая композиция и вторая

композиция вводятся одновременно или последовательно. В некоторых вариантах реализации изобретения введение второй композиции индуцирует экспрессию одного или более цитокинов, способных вовлекать Т-клетки CD8 в локальное место введения.

[0013] В другом варианте реализации изобретения предлагается вышеупомянутый способ, отличающийся тем, что первую композицию и вторую композицию вводят последовательно, и при этом первую композицию вводят субъекту в первое место, а вторую композицию вводят субъекту во второе место, причем первое место и второе место различны. В еще одном варианте реализации изобретения предлагается вышеупомянутый способ, отличающийся тем, что первую композицию вводят в первое место с помощью первого пути введения и вторую композицию вводят во второе место с помощью второго пути введения.

[0014] В другом варианте реализации настоящего изобретения предлагается вышеупомянутый способ, отличающийся тем, что первый путь и второй путь различны и каждый из них выбирается из парентерального, энтерального, перорального, внутримышечного, внутрикожного, подкожного, внутриопухолевого, интранодального, перинодального, интраназального, трансдермального, ингаляционного, через слизистую оболочку, внутрипузырного и местного. В другом варианте реализации изобретения первый путь является внутримышечным, внутрикожным или подкожным, а второй путь является внутрипузырным, внутриопухолевым или интранодальным.

[0015] В еще одном варианте реализации изобретения предлагается вышеупомянутый способ, отличающийся тем, что первую композицию вводят до введения второй композиции. В другом варианте реализации изобретения предлагается вышеупомянутый способ, отличающийся тем, что вторую композицию вводят до введения первой композиции. В другом варианте реализации изобретения первую композицию и вторую композицию вводят одновременно, но в разные места. В еще одном варианте реализации изобретения предлагается вышеупомянутый способ, отличающийся тем, что первую композицию и/или вторую композицию вводят 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз.

[0016] В другом варианте реализации настоящего изобретения предлагается вышеупомянутый способ, отличающийся тем, что рекомбинантный экспрессионный вектор выбирается из ретровирусного векторного генома, лентивирусного векторного генома, поксвирусного векторного генома, векторного генома вируса осповакцины, аденовирусного векторного генома, векторного генома вируса, ассоциированного с аденовирусом, герпесвирусного векторного генома, альфа-вирусного векторного генома, плазмидной ДНК и РНК. В другом варианте реализации настоящего изобретения векторная частица представляет собой лентивирусную векторную частицу, которая содержит лентивирусный векторный геном; поксвирусную векторную частицу, которая содержит поксвирусный векторный геном; векторную частицу вируса осповакцины, которая содержит геном вируса осповакцины; аденовирусную векторную частицу, которая содержит аденовирусный векторный геном; векторную частицу вируса, ассоциированного с аденовирусом, которая содержит векторный геном вируса, ассоциированного с аденовирусом; герпесвирусную векторную частицу, которая содержит герпесвирусный векторный геном; или альфа-вирусную векторную частицу, которая содержит альфа-вирусный векторный геном. В еще одном варианте реализации изобретения векторная частица представляет собой лентивирусную векторную частицу и содержит лентивирусный векторный геном. В еще одном варианте реализации изобретения лентивирусная векторная частица дополнительно содержит оболочку, содержащую гликопротеин E2 вируса Синдбис, имеющий по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с SEQ ID NO:1, при этом остаток 160 либо отсутствует, либо аминокислота не является глутаминовой кислотой, и при этом гликопротеид E2 не является частью слитого белка с белком E3 вируса Синдбис.

[0017] В другом варианте реализации изобретения предлагается вышеупомянутый способ, отличающийся тем, что векторная частица доставляет рекомбинантный экспрессионный вектор к антиген-представляющей клетке. В одном варианте реализации изобретения антиген-представляющая клетка представляет собой дендритную клетку.

[0018] В еще одном варианте реализации изобретения предлагается вышеупомянутый способ, отличающийся тем, что иммуноген представляет собой вирусный антиген из онкогенного вируса. Типичные онкогенные вирусы включают, но не ограничиваются ими, EBV, HPV, HBV, HCV, HTLV и KSHV. Типичные вирусные антигены из онкогенных вирусов, которые могут быть использованы в данном изобретении, включают, но не ограничиваются ими, EBV: EBNA-1, LMP-1, LMP-2A; HPV: E6, E7, E5; HBV: HBx; HCV: Core, NS3, Ns5A; HTLV: Tax, HBZ; KSHV: vFLIP, LANA, vGPCR, vIRF-1.

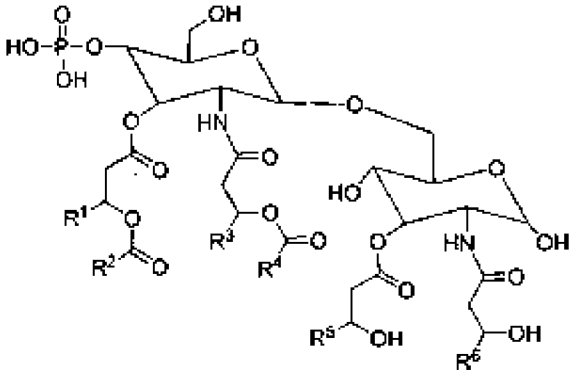
[0019] В другом варианте реализации изобретения иммуноген представляет собой опухолеассоциированный антиген. В другом варианте реализации изобретения опухолеассоциированный антиген выбирается из p53, Ras, c-Myc, A-Raf, B-Raf, C-Raf, циклин-зависимых киназ, CTA, NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10, GAGE, PRAME; BAGE; RAGE, SAGE, HAGE, MPHOSPH1, DEPDC1, IMP3 и MAGE-A, T-антигена BK, MAGE-A2, MAGE-A6, MAGE-A12, MART-1, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MC1R, Gp100, PSA, PSM, тирозиназы, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, фосфоинозитидных 3-киназ (PI3K), рецепторов TRK, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, антигена опухоли Вильмса (WT1), AFP, β-катенина/m, каспазы-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, миозина/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, аннексина II, CDC27/m, TPI/mbcr-abl, BCR-ABL, регуляторного фактора интерферона 4 (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RARα, опухолеассоциированного преобразователя сигнала кальция 1 (TACSTD1) TACSTD2, рецепторных тирозинкиназ, рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), EGFRvIII, рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGFR), рецептора фактора роста сосудистого эндотелия (VEGFR), цитоплазматических тирозинкиназ, src-семейства, syk-ZAP70, интегрин-связанной киназы (ILK), преобразователей сигналов и активаторов транскрипции STAT3, STAT5 и STAT6, факторов, индуцируемых гипоксией, HIF-1α и HIF-2α, ядерного фактора-каппа в (NF-κB),

рецепторов Notch, Notch1-4, c-Met, мишеней рапамицина у млекопитающих (mTOR), WNT, киназ, регулируемых внеклеточными сигналами (ERK), PMSA, PR-3, MDM2, мезотелина, раковых клеток почек - 5T4, SM22-альфа, карбоангидраз I (CAI) и IX (CAIX), STEAD, TEL/AML1, GD2, протеиназы 3, hTERT, контрольных точек транслокации саркомы, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (слитый ген TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, андрогенового рецептора, циклина B1, полисиаловой кислоты, MYCN, RhoC, GD3, фукозила GM1, мезотелиана, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboH, NY-BR-1, RGs5, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, белка спермы 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, легумаина, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2 и fos-связанного антигена 1.

[0020] В другом варианте реализации изобретения предлагается вышеупомянутый способ, отличающийся тем, что опухолеассоциированный антиген выбирается из антигена рака мочевого пузыря. В одном варианте реализации изобретения антиген рака мочевого пузыря выбирается из CTA, NY-ESO-1, LAGE-1,MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10, GAGE, PRAME; BAGE; RAGE, SAGE, HAGE, MPHOSPH1, DEPDC1, IMP3 и MAGE-A, и T-антигена BK.

[0021] В еще одном варианте реализации настоящего изобретения предлагается вышеупомянутый способ, отличающийся тем, что индуцированный иммунный ответ включает иммунный ответ цитотоксических T-лимфоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагается описанный в настоящем документе способ, отличающийся тем, что индуцированный иммунный ответ включает антиген-специфические T-клетки CD4 и/или CD8, эффекторные T-клетки памяти (T_{EM}), центральные T-клетки памяти (T_{CM}) и/или тканево-резидентные T-клетки памяти (T_{RM}). В некоторых вариантах реализации способов, предложенных в настоящем документе, одна или более из этих популяций клеток собирается на локальном участке, представляющем интерес (например, на слизистой оболочке, внутри опухоли, внутри лимфатического узла). В другом варианте реализации изобретения предлагается вышеупомянутый способ, отличающийся тем, что индуцированный иммунный ответ включает продукцию иммуноген-специфического антитела.

[0022] В еще одном варианте реализации изобретения предлагается вышеупомянутый способ, отличающийся тем, что адъювант представляет собой адъювант, связанный с нетоксичным липидом А. В одном варианте реализации изобретения адъювант, связанный с нетоксичным липидом А, представляет собой глюкопиранозил липид А (GLA). В другом варианте реализации изобретения GLA готовится в виде стабильной эмульсии типа масло-в-воде. В еще одном варианте реализации изобретения GLA имеет формулу:



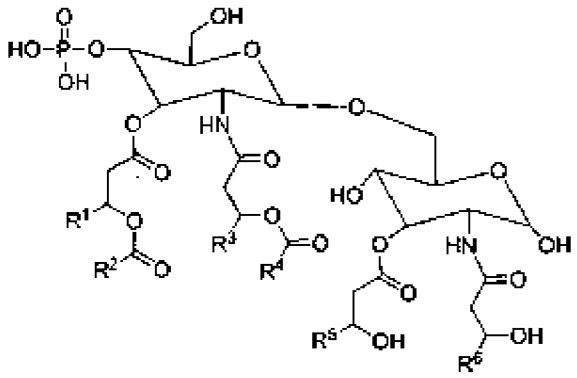
где: R^1, R^3, R^5 и R^6 представляют собой алкил C_{11}-C_{20}; а R^2 и R^4 представляют собой алкил C_{12}-C_{20}. В еще одном варианте реализации изобретения R^1, R^3, R^5 и R^6 равны ундецилу, а R^2 и R^4 равны тридецилу.

[0023] В некоторых вариантах реализации способов, описанных в настоящем документе, способ дополнительно включает введение композиции, содержащей БЦЖ. В другом варианте реализации настоящего изобретения предлагается способ, отличающийся тем, что адъювантная композиция дополнительно содержит БЦЖ.

[0024] В другом варианте реализации изобретения предлагается вышеупомянутый способ, отличающийся тем, что первая композиция дополнительно содержит адъювант.

[0025] В еще одном варианте реализации изобретения предлагается способ лечения вирус-индуцированного рака, включающий а) индуцирование иммунного ответа, специфического для иммуногена, ассоциированного с вирус-индуцированным раком (например, вирусный антиген, полученный из вируса, ассоциированного с раком), у субъекта, включающий введение субъекту первой композиции, содержащей лентивекторную частицу,

причем лентивекторная частица содержит рекомбинантный экспрессионный вектор, при этом рекомбинантный экспрессионный вектор, включает полинуклеотид, кодирующий иммуноген, причем полинуклеотид функционально связан по меньшей мере с одной регулирующей экспрессию последовательностью, при этом лентивирусная векторная частица дополнительно содержит оболочку, содержащую гликопротеин E2 вируса Синдбис, имеющий по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с SEQ ID NO:1, в которой остаток 160 либо отсутствует, либо аминокислота не является глутаминовой кислотой, и при этом гликопротеин E2 не является частью слитого белка с белком E3 вируса Синдбис; и b) индуцирование экспрессии одного или более цитокинов, способных вовлекать Т-клетки CD8 в опухоль, включающее введение субъекту второй композиции, содержащей фармацевтически приемлемый адъювант, при этом адъювант представляет собой адъювант, связанный с нетоксичным липидом А, который является глюкопиранозил липидом А (GLA), приготовленным в стабильной эмульсии типа масло в воде, при этом GLA имеет формулу:



где: R^1, R^3, R^5 и R^6 равны ундецилу, а R^2 и R^4 равны тридецилу; при этом цитокины выбираются из группы, состоящей из Cxcl9, Cxcl10, CCL2, CCL3, MCP-1, TNFa, IFNc и IP-10; при этом иммуноген, ассоциированный с вирус-индуцированным раком, представляет собой вирусный антиген, выбранный из EBNA-1, LMP-1, LMP-2A; E6, E7, E5; HBx; HCV Core, NS3, Ns5A; Tax, HBZ; vFLIP, LANA, vGPCR, vIRF-1; при этом как первая композиция, так и вторая композиция дополнительно содержат фармацевтически приемлемое вспомагательное вещество, при этом первую композицию и вторую композицию вводят одновременно или последовательно, при

этом первую композицию вводят внутримышечно, внутрикожно или подкожно, а вторую композицию вводят внутрь опухоли или внутрь мочевого пузыря; и при этом вторая композиция необязательно содержит БЦЖ.

[0026] В другом варианте реализации настоящего изобретения предлагается набор, содержащий первую композицию и вторую композицию по любому одному из предшествующих способов, указанных выше или описанных в настоящем документе.

[0027] В другом аспекте настоящего изобретения предлагается способ лечения рака, индуцированного онкогенным вирусом, включающий: a) индуцирование у субъекта иммунного ответа, специфического для антигена онкогенного вируса, включающее введение субъекту первой композиции, содержащей векторную частицу, причем векторная частица содержит рекомбинантный экспрессионный вектор, при этом рекомбинантный экспрессионный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий антиген онкогенного вируса, и при этом полинуклеотид функционально связан по меньшей мере с одной регулирующей экспрессию последовательностью; и b) введение субъекту в локальный участок тела второй композиции, содержащей фармацевтически приемлемый адъювант, при этом как первая композиция, так и вторая композиция дополнительно содержат фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, и причем первую композицию и вторую композицию вводят одновременно или последовательно. В одном варианте реализации изобретения введение второй композиции в локальный участок тела индуцирует экспрессию одного или более цитокинов, способных вовлекать Т-клетки в локальный участок введения. В некоторых вариантах реализации изобретения Т-клетки представляют собой антиген-специфические Т-клетки, такие как антиген-специфические Т-клетки CD4 и/или CD8, эффекторные Т-клетки памяти (T_{EM}), центральные Т-клетки памяти (T_{CM}) и/или ткане-резидентные Т-клетки памяти (T_{RM}). В одном варианте реализации способа локальный участок для местного введения находится внутри опухоли, внутри лимфатического узла, внутри мочевого пузыря или на слизистых оболочках. В другом варианте реализации изобретения экспрессионный вектор дополнительно содержит полинуклеотид,

кодирующий опухолеассоциированный антиген. В дополнительном варианте реализации изобретения вторая композиция дополнительно содержит опухолеассоциированный антиген.

[0028] В одном из конкретных аспектов настоящего изобретения предлагается способ лечения рака, индуцированного онкогенным вирусом, у субъекта, включающий: a) индуцирование у субъекта иммунного ответа, специфического для антигена, полученного из онкогенного вируса, включающее введение субъекту первой композиции, содержащей векторную частицу, причем векторная частица содержит рекомбинантный экспрессионный вектор, при этом рекомбинантный экспрессионный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий антиген, полученный из онкогенного вируса, и при этом полинуклеотид функционально связан по меньшей мере с одной регулирующей экспрессию последовательностью; и b) введение субъекту внутрь опухоли второй композиции, содержащей фармацевтически приемлемый адъювант, при этом как первая композиция, так и вторая композиция дополнительно содержат фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, и при этом первую композицию и вторую композицию вводят одновременно или последовательно. В одном варианте реализации изобретения введение второй композиции внутрь опухоли индуцирует экспрессию одного или более цитокинов или хемокинов, способных вовлекать в опухоль Т-клетки, в частности, антиген-специфические Т-клетки (например, Т-клетки CD4 и/или CD8, эффекторные Т-клетки памяти (T_{EM}), центральные Т-клетки памяти (T_{CM}) и/или ткане-резидентные Т-клетки памяти (T_{RM})).

[0029] В другом аспекте настоящего изобретения предлагается способ лечения рака, включающий: a) индуцирование у субъекта иммунного ответа, специфического для антигена, ассоциированного с раком, включающее введение субъекту первой композиции, содержащей векторную частицу, причем векторная частица содержит рекомбинантный экспрессионный вектор, при этом рекомбинантный экспрессионный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий антиген, ассоциированный с раком, и при этом полинуклеотид функционально связан по меньшей мере с одной регулирующей экспрессию последовательностью; и b) введение субъекту внутрь

опухоли второй композиции, содержащей фармацевтически приемлемый адъювант, при этом как первая композиция, так и вторая композиция дополнительно содержат фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, и при этом первую композицию и вторую композицию вводят одновременно или последовательно.

[0030] В некоторых вариантах реализации способов лечения рака, включая онковирус-индуцированные раковые заболевания, первую композицию и/или вторую композицию вводят 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз. В другом варианте реализации изобретения рекомбинантный экспрессионный вектор выбирается из ретровирусного векторного генома, лентивирусного векторного генома, поксвирусного векторного генома, векторного генома вируса осповакцины, аденовирусного векторного генома, векторного генома вируса, ассоциированного с аденовирусом, герпесвирусного векторного генома, альфа-вирусного векторного генома, плазмидной ДНК и РНК. В еще одном дополнительном варианте реализации способов, описанных в настоящем документе, векторная частица представляет собой ретровирусную векторную частицу, которая содержит ретровирусный векторный геном; лентивирусную векторную частицу, которая содержит лентивирусный векторный геном; поксвирусную векторную частицу, которая содержит поксвирусный векторный геном; векторную частицу вируса осповакцины, которая содержит геном вируса осповакцины; аденовирусную векторную частицу, которая содержит аденовирусный векторный геном; векторную частицу вируса, ассоциированного с аденовирусом, которая содержит векторный геном вируса, ассоциированного с аденовирусом; герпесвирусную векторную частицу, которая содержит герпесвирусный векторный геном; или альфа-вирусную векторную частицу, которая содержит альфа-вирусный векторный геном. В одном варианте реализации изобретения векторная частица представляет собой лентивирусную векторную частицу и содержит лентивирусный векторный геном. В одном конкретном варианте реализации изобретения лентивирусная векторная частица дополнительно содержит оболочку, содержащую гликопротеин E2 вируса Синдбис, имеющий по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с SEQ ID NO:1, при этом остаток 160 либо

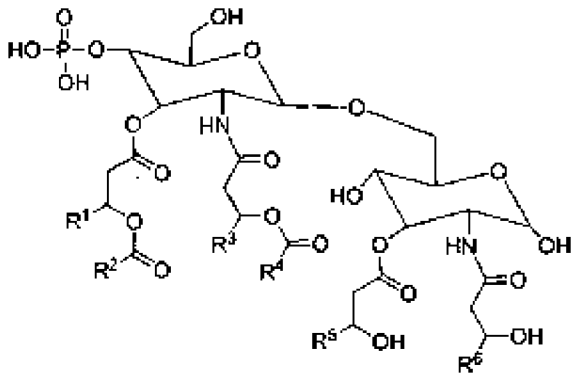
отсутствует, либо аминокислота не является глутаминовой кислотой, и при этом гликопротеид E2 не является частью слитого белка с белком E3 вируса Синдбис. В другом варианте реализации способов, описанных в настоящем документе, векторная частица доставляет рекомбинантный экспрессионный вектор к дендритной клетке. В некоторых вариантах реализации способов, описанных в настоящем документе, иммуноген представляет собой опухолеассоциированный антиген и может быть выбран из CTA, NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10, GAGE, PRAME; BAGE; RAGE, SAGE, HAGE, MPHOSPH1, DEPDC1, IMP3 и MAGE-A, и T-антигена BK, p53, Ras, c-Myc, A-Raf, B-Raf, C-Raf, циклин-зависимых киназ, MAGE-A2, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSA, PSM, тирозиназы, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, фосфоинозитидных 3-киназ (PI3K), рецепторов TRK, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, антигена опухоли Вильмса (WT1), AFP, β-катенина/m, каспазы-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, миозина/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, аннексина II, CDC27/m, TPI/mbcr-abl, BCR-ABL, регуляторного фактора интерферона 4 (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RARα, опухолеассоциированного преобразователя сигнал кальция 1 (TACSTD1) TACSTD2, рецепторных тирозинкиназ, рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), EGFRvIII, рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGFR), рецептора фактора роста сосудистого эндотелия (VEGFR), цитоплазматических тирозинкиназ, src-семейства, syk-ZAP70, интегрин-связанной киназы (ILK), преобразователей сигналов и активаторов транскрипции STAT3, STAT5 и STAT6, факторов, индуцируемых гипоксией, HIF-1α и HIF-2α, ядерного фактора-каппа в (NF-κB), рецепторов Notch, Notch1-4, c-Met, мишеней рапамицина у млекопитающих (mTOR), WNT, киназ, регулируемых внеклеточными сигналами (ERK), PMSA, PR-3, MDM2, мезотелина, раковых клеток почек - 5T4, SM22-альфа, карбоангидраз I (CAI) и IX (CAIX), STEAD, TEL/AML1, GD2, протеиназы 3, hTERT, контрольных точек

транслокации саркомы, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (слитый ген TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, андрогенового рецептора, циклина B1, полисиаловой кислоты, MYCN, RhoC, GD3, фукозила GM1, мезотелиана, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboH, NY-BR-1, RGs5, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, белка спермы 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, легумаина, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2 и fos-связанного антигена 1.

[0031] В другом варианте реализации способов, описанных в настоящем документе, антиген рака мочевого пузыря выбирается из CTA, NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10, GAGE, PRAME; BAGE; RAGE, SAGE, HAGE, MPHOSPH1, DEPDC1, IMP3 и MAGE-A, и T-антигена BK.

[0032] В одном варианте реализации способов для лечения рака, описанных в настоящем документе, индуцированный иммунный ответ включает иммунный ответ цитотоксических Т-лимфоцитов и продукцию иммуноген-специфического антитела.

[0033] В некоторых вариантах реализации способов для лечения рака, описанных в настоящем документе, адъювант представляет собой адъювант, связанный с нетоксичным липидом A. В частности, адъювант, связанный с нетоксичным липидом A, представляет собой глюкопиранозил липид A (GLA). В некоторых вариантах реализации изобретения GLA готовится в виде стабильной эмульсии типа масло в воде. В одном варианте реализации изобретения GLA имеет формулу:



где: R^1, R^3, R^5 и R^6 представляют собой алкил C_{11}-C_{20}; а R^2 и R^4 представляют собой алкил C_{12}-C_{20}. В другом варианте реализации изобретения R^1, R^3, R^5 и R^6 равны ундецилу, а R^2 и R^4 равны тридецилу.

[0034] В другом аспекте настоящего изобретения предлагается способ увеличения количества Т-клеток в опухолевом микроокружении, включающий: a) введение субъекту, имеющему опухоль, первой композиции, содержащей векторную частицу, причем векторная частица содержит рекомбинантный экспрессионный вектор, при этом рекомбинантный экспрессионный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий антиген, ассоциированный с раком, и при этом полинуклеотид функционально связан по меньшей мере с одной регулирующей экспрессию последовательностью, тем самым индуцируя у субъекта иммунный ответ против антигена, ассоциированного с раком; и b) введение субъекту внутриопухолево или перитуморально второй композиции, содержащей агонист TLR4, причем композиция не содержит антиген; при этом как первая композиция, так и вторая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, и при этом первую композицию и вторую композицию вводят одновременно или последовательно; тем самым увеличивая количество Т-клеток в опухолевом микроокружении. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения векторная частица представляет собой лентивирусную векторную частицу, которая содержит лентивирусный векторный геном; поксвирусную векторную частицу, которая содержит поксвирусный векторный геном; векторную частицу вируса осповакцины, которая содержит геном вируса осповакцины; аденовирусную векторную частицу, которая содержит аденовирусный векторный геном; векторную частицу вируса, ассоциированного с аденовирусом, которая содержит векторный геном вируса, ассоциированного с аденовирусом; герпесвирусную векторную частицу, которая содержит герпесвирусный векторный геном; или альфа-вирусную векторную частицу, которая содержит альфа-вирусный векторный геном. В другом варианте реализации изобретения векторная частица представляет собой лентивирусную векторную частицу и содержит лентивирусный векторный геном. В дополнительных вариантах реализации изобретения лентивирусная векторная частица дополнительно содержит оболочку, содержащую гликопротеин E2 вируса Синдбис, имеющий по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с SEQ ID NO:1, при этом

остаток 160 либо отсутствует, либо аминокислота не является глутаминовой кислотой, и при этом гликопротеид E2 не является частью слитого белка с белком E3 вируса Синдбис, а в некоторых вариантах реализации изобретения доставляет рекомбинантный экспрессионный вектор к дендритной клетке. В некоторых вариантах реализации способа агонист TLR4 представляет собой адъювант, связанный с нетоксичным липидом A, такой как GLA, описанный в настоящем документе, и может быть приготовлен в виде стабильной эмульсии типа масло в воде.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0035] **Фигура 1.** Стратегия вакцинации "прайм-пулл". Мышам C57BL/6 (5 мышей на группу) прививали клетки B16F10-OVA на День 0. Через десять дней после инокуляции опухоли мышей с опухолью иммунизировали VP02/OVA или VP02/GFP (контрольный вектор) в основание хвоста. Через двадцать один день после инокуляции опухоли иммунизированным мышам внутриопухолево вводили GLA/SE. Опухоли собирали непосредственно перед (D+0), через день после (D+1), или через два дня после (D+2) введения GLA/SE. Собранные клетки окрашивали для анализа проточной цитометрии. **Фигура 1 (A)** - Репрезентативные точечные диаграммы анализируемых моментов времени. Область, очерченная красным, включает OVA-специфические клетки CD3ε+CD8α +. **Фигура 1 (B)** - Средний процент OVA-специфических клеток CD3ε+CD8α+анализируемых моментов времени.

[0036] **Фигура 2.** Вовлечение лимфоцитов в опухоль с помощью стратегии вакцинации "прайм-пулл". Мышам C57BL/6 (5 мышей на группу) прививали клетки B16F10-OVA в количестве 1×10^5, п/к., во фланк, на День 0. Через семь дней после инокуляции опухоли мышей с опухолью иммунизировали VP02/OVA или VP02/GFP (контрольный вектор) в основание хвоста. Начиная со Дня 7 (D7) или Дня 14 (D14) после опухолевого заражения, иммунизированным мышам вводили 5 мкг GLA/2% SE каждые 3-4 дня внутрь опухоли. Опухоли собирали на День 18. Проникающие в опухоль лимфоциты изолировали на 1:1 подушке Histopaque®-1083 и окрашивали пентамерами MHC-I/SIINFEKL, CD3, CD8, CD4, CD25 и антителами FOXP3 для анализа проточной цитометрии. **Фигура 2 (A)** - Проиллюстрированы

репрезентативные точечные диаграммы стратегии гейтирования с обозначением средних групповых %. **Фигура 2 (B)** - Диаграмма разброса, демонстрирующая % клеток пентамер$^+$ и % регуляторных Т-клеток для каждой группы. Планки погрешностей отображают среднее значение ± СОС.

[0037] **Фигура 3.** Терапевтическая эффективность стратегии вакцинации "прайм-пулл". **Фигура 3 (A)** - Мышам C57BL/6 (5 мышей на группу) прививали клетки B16F10-OVA в количестве 1×10^5, п/к, во фланк, на День 0. Через семь дней после инокуляции опухоли мышей с опухолью иммунизировали VP02/OVA или VP02/GFP (контрольный вектор) в основание хвоста. Начиная со Дня 7 (D7) или Дня 14 (D14) после опухолевого заражения, иммунизированным мышам вводили 5 мкг GLA/2% SE каждые 3-4 дня внутрь опухоли. **Фигура 3 (B)** - Мышам BALB/c (5 мышей на группу) прививали клетки CT26 в количестве 1×10^5, п/к, во фланк, на День 0. Через семь дней после инокуляции опухоли мышей с опухолью иммунизировали VP02/AH1A5 или VP02/GFP (контрольный вектор) в основание хвоста. Начиная со Дня 7 (D7) или Дня 14 (D14) после опухолевого заражения, иммунизированным мышам вводили 5 мкг GLA/2% SE каждые 3-4 дня внутрь опухоли. Размер опухолей измеряли 2-3 раза в неделю. Объем опухоли рассчитывали на основе модифицированной эллипсоидной формулы: длина x ширина^2 x $\pi/6$. Планки погрешностей отображают среднее значение ± СОС.

Подробное описание ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0038] В настоящем изобретении предлагается, в частности, комплексная иммунотерапия раковых заболеваний, таких как вирусно-индуцированные раковые заболевания, включающая (i) лентивирусную векторную частицу (LV), нацеленную на дендритные клетки и экспрессирующую один или более вирусных антигенов или антигенов, ассоциированных с раком (или оба), вводимую внутрикожно, подкожно или внутримышечно в качестве "прайм"-иммунизации; (ii) синтетический агонист TLR4 глюкопиранозил липид А (GLA), применяемый без антигена, при необходимости повторно, внутриопухолево или перитуморально, в качестве монотерапии или в комбинации с другим терапевтическим агентом

(либо внутриопухолево, либо перитуморально, или вводимый другим путем, но в сочетании с GLA; например, ингибирующими или ко-стимулирующими антителами иммунной контрольной точки, ингибиторам автофагии, лучевой терапией и т.д.).

[0039] Настоящее изобретение может быть использовано при любом раке, включая вирусно-индуцированный рак, такой как клеточная карцинома Меркеля (вирус полиомы Меркеля, большой Т-антиген), раковые заболевания головы и шеи (HPV; антигены E6 и E7), рак шейки матки (HPV; антигены E6 и E7), рак печени (гепатит B - большие, средние и малые S-антигены; вирус гепатита C), рак носоглотки (EBV; EB ядерный антиген 1 (EBNA1), латентный мембранный белок-1 и -2 (LMP -1), LMP-2), саркома Капоши (HHV8) и глиобластома (человеческий цитомегаловирус, pp65, IE1, us28).

[0040] Не желая быть связанными теорией, использование экспрессионных векторов, включая вирусные векторы, экспрессирующие один или несколько вирусных антигенов или один или несколько опухолевых антигенов, в комбинации с внутриопухолевым введением агониста TLR4, такого как GLA, описанного в настоящем документе, в новом применении ("прайм/пулл") приводит к местной продукции цитокинов внутри или вокруг опухоли, включая cxcl9 и cxcl10, которые будут направлять системно или местно индуцированные опухолеспецифические цитотоксические Т-клетки к месту локализации рака. И вновь, не желая быть связанными теорией, с помощью этого механизма и иммуно-стимулирующего эффекта агониста TLR4, такого как GLA (например, усиление антигенной презентации дендритными клетками, а также их созревание посредством стимуляции рецептора TLR4) эффективность иммунотерапии раковых заболеваний, включая вирус-индуцированные раковые заболевания, будет значительно повышена.

[0041] Первое сообщение о стратегии "прайм/пулл" с использованием системного первичного воздействия ("прайм") лентивектора для индуцирования Т-клеток CD8 с последующей внутриопухолевой инъекцией лигандов толл-подобных рецепторов для повышения терапевтической эффективности было опубликовано в 2013 году Xiao et al. (J. Immunotherapy, 2013 June 1; 190(11): 5866-5873). В этих экспериментах для иммунизации применяли VSV-

псевдотиповый лентивектор, а также внутрь опухоли (в/о) вводили агонисты толл-подобного рецептора 3 (поли-I:C) и 9 (CpG). Несмотря на то, что исследователи наблюдали терапевтический эффект, отличающийся от настоящего описания, в/о введение лигандов TLR3/9 уменьшало абсолютное число TIL CD8 и CD4 по сравнению с иммунизацией одним только лентивирусным вектором (см. Xiao et al., Фиг. 2A), что указывает на то, что усиление противоопухолевого эффекта при инъекции лигандов TLR 3/9 не было связано с увеличением числа TIL CD8 и CD4. Таким образом, специалист в данной области техники не станет применять в/о или местное введение агонистов TLR для привлечения Т-клеток к месту локализации опухоли с учетом этого исследования.

[0042] В одном аспекте в целях удовлетворения неудовлетворенных потребностей существующих методов лечения вирус-индуцированных раковых заболеваний (включая, но не ограничиваясь ими, рак мочевого пузыря, карциному из клеток Меркеля, саркому Капоши, лимфому Беркитта, неходжкинскую лимфомы, посттрансплантационный лимфопролиферативный синдром, рак носоглотки, рак шейки матки, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярную карциному, Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых), в настоящем изобретении предлагаются композиции и способы индуцирования и/или усиления специфического противовирусного ответа Т-клеток CD8, который перенаправлен на опухоль. С этой целью проводится иммунизация, например, рекомбинантным экспрессионным вектором, к примеру, лентивектором, описанным в настоящем документе и нацеленным на дентритные клетки и экспрессирующим специфический вирусный антиген, или в некоторых вариантах реализации изобретения - антигеном (антигенами), ассоциированным с раковой опухолью или и тем и другим (т.е. "иммуногеном"), с последующим местным введением (например, внутрь опухоли, внутрь лимфатического узла, через слизистую оболочку или внутрь пузыря) агониста TLR, такого как агонист TLR4 глюкопиранозил липид А (GLA), как описано в настоящем документе. Это приводит к индуцированию Т-клеток CD8, специфических к вирусному антигену, их перенаправлению или вовлечению или хомингу в опухоль, что приводит к

терапевтическому эффекту, превосходящему существующие методы иммунотерапии. В связи с этим, и не желая быть связанными теорией, опухолеассоциированные вирусные антигены, такие как описанные в настоящем документе (например, HPV-E6/E7) являются чужеродными антигенами и, как таковые, являются более иммуногенными, чем эндогенные опухолеассоциированные антигены, что повышает эффективность иммунотерапии.

[0043] В некоторых вариантах реализации изобретения (например, при раке мочевого пузыря) местное введение может необязательно включать БЦЖ, как описано в настоящем документе, а также в некоторых вариантах реализации изобретения антиген-специфический CD8 Т-клеточный ответ перенаправляется на слизистую оболочку мочевого пузыря.

[0044] Следовательно, в одном варианте реализации настоящего изобретения предлагается иммунизация "прайм-пулл", причем "прайм"- или в некоторых вариантах реализации изобретения "прайм/буст"- композиция содержит, например, рекомбинантный экспрессионный вектор, экспрессирующий специфический иммуноген (например, один или более опухолеассоциированных антигенов; один или более вирусных антигенов, при этом вирус представляет собой онкогенный вирус, ассоциированный с раком), для того, чтобы индуцировать ответ Т-клеток CD8 с последующим введением "пулл"-композиции, содержащей агонист TLR4, такой как GLA с целью привлечения Т-клеток CD8 в опухоль. Как было отмечено выше, опухолеассоциированные вирусные антигены являются более иммуногенными, чем эндогенные опухолеассоциированные антигены, что повышает эффективность иммунотерапии. Тем не менее, в некоторых вариантах реализации изобретения иммуноген может быть рак-ассоциированным антигеном, не связанным с онкогенным вирусом. Согласно некоторым вариантами реализации настоящего изобретения, экспрессионный вектор и агонист TLR4 можно вводить множество раз, в различные места, а также использовать различные пути, как описано в настоящем документе. "Прайм-пулл"-иммунизация была также описана в международной публикации № WO 2013/172927, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[0045] В одном варианте реализации настоящего изобретения предлагается первая "прайм"- или "прайм/буст"- композиция, содержащая, например, рекомбинантный экспрессионный вектор, экспрессирующий специфический(е) антиген(ы), ассоциированный(е) с раковой опухолью мочевого пузыря, или иммуноген(ы) для того, чтобы индуцировать ответ Т-клеток CD8, и "пулл"-композиция, содержащая агонист TLR4, такой как GLA, с БЦЖ или без нее, с целью привлечения Т-клеток, включая Т-клетки CD8, на слизистую оболочку мочевого пузыря. Согласно некоторым вариантами реализации настоящего изобретения, экспрессионный вектор и агонист TLR (с БЦЖ или без нее) можно вводить множество раз, в различные места, а также использовать различные пути, как описано в настоящем документе. Соответственно, в настоящем изобретеним предлагается комплексная иммунотерапия первой линии при подтвержденном раке мочевого пузыря.

[0046] В одном варианте реализации настоящего изобретения предлагается способ, включающий введение (i) вакцины на основе лентивектора, нацеленного на дендритные клетки, экспрессирующей один или более онкогенных вирусных антигенов или иммуногенов (например, один или более антигенов из вируса, ассоциированного с индуцированием рака), применяемой внутрикожно, подкожно или внутримышечно в качестве "прайм"- иммунизации; (ii) той же вакцины, применяемой внутрь опухоли в качестве "буст"- иммунизации; (iii) синтетического GLA, применяемого неоднократно внутрь опухоли в качестве монотерапии, или в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения - в сочетании с онкогенным вирусным антигеном или опухолеассоциированным антигеном, в качестве поддерживающей терапии и для направления системно или локально примированных цитотоксических Т-клеток в опухоль.

[0047] В одном варианте реализации настоящего изобретения предлагается способ, включающий введение (i) вакцины на основе лентивектора, нацеленного на дендритные клетки, экспрессирующей один или более онкогенных вирусных антигенов и один или более опухолеассоциированных антигенов или иммуногенов, применяемой внутрикожно, подкожно или внутримышечно в качестве "прайм"- иммунизации; (ii) той же вакцины, применяемой внутрь пузыря в

качестве "буст"- иммунизации; (iii) синтетического GLA, применяемого неоднократно на слизистую оболочку, внутрь опухоли или внутрь пузыря в качестве монотерапии, или необязательно - в комбинации с БЦЖ в качестве поддерживающей терапии и для направления системно или локально примированных цитотоксических Т-клеток в слизистую оболочку мочевого пузыря. Такой способ используется для лечения вирус- индуцированных раковых заболеваний. В некоторых вариантах реализации изобретения способы, описанные в настоящем документе, используются для лечения рака мочевого пузыря.

[0048] Использование местного введения GLA приведет к местной продукции цитокинов в опухоли, включая, но не ограничиваясь ими, Cxcl9 и Cxcl10, которые направят системно или местно индуцированные вирус-специфические цитотоксические Т-клетки или опухоль-специфические цитотоксические Т-клеток в опухоль, где вирусный антиген экспрессируется опухолевыми клетками. Не желая быть связанными теорией, с помощью механизма стимуляции рецептора TLR4 посредством GLA, эффективность иммунотерапии вирус-индуцированного рака будет значительно повышена.

[0049] В другом аспекте настоящего изобретения первичный ("прайм") иммунный ответ может быть достигнут за счет адаптивно перенесенных иммунных клеток в организм пациента. Для этого клетки могут быть выделены из субъекта, модифицированы *ex vivo*, а затем перенесены обратно в организм пациента. Местное введение пригодной композиции, такой как агонист TLR4 (например, GLA) или другой адъювантной композиции, как описано в настоящем документе, затем используется для "подтягивания" (″pull″) адоптивно перенесенных клеток в опухоль или локальное место введения. Иммунные клетки могут быть модифицированы *ex vivo* с помощью различных способов, известных специалистам в данной области техники, так, например, клетки могут быть увеличены с помощью различных технологий с целью выработки антиген-специфических или поликлональных Т-клеток (см., например, Ridell et al., J. Immunol. Meth. (1990) 128:189-201; Riddell et al.,

Science (1992) 257:238-241; US5827642; US6040177; US6692964; US6352694); генетически модифицированы с использованием технологии химерного антигенного рецептора (см., например, патенты США 8906682; 8916381; 7741465; 5843728; 7446190; 6392013; WO 2012/079000, технологий химерных TCR или другой генетической модификации (см., например, US8741814; US20130189309). В некоторых вариантах реализации изобретения клетки могут быть выделены от донора, не являющегося субъектом, или в других вариантах реализации изобретения клетки могут быть получены из соответствующей клеточной линии или искусственной клетки, модифицированной таким образом, чтобы быть совместимой с субъектом.

[0050] Таким образом, в другом аспекте настоящего изобретения предлагается способ лечения рака у субъекта путем 1) введения субъекту первой композиции, содержащей Т-клетки, специфические к опухолеассоциированному антигену, которые были увеличены в количестве или модифицированы *ex vivo*, генетически модифицированные CAR-Т-клетки, которые были генетически модифицированы с целью распознавания опухолеассоциированного антигена или Т-клетки, генетически модифицированы для экспрессии специфического химерного Т-клеточного рецептора (TCR), распознающего эпитоп, ассоциированный с раком, в контексте MHC; 2) местного введения субъекту (например, в опухоль) второй композиции, содержащей фармацевтически приемлемый адъювант, как описано в настоящем документе, для подтягивания адоптивно перенесенных клеток к опухоли; тем самым осуществляя лечение рака у субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения адоптивно перенесенные клетки могут быть бустированы путем введения субъекту экспрессионного вектора, как описано в настоящем документе, перед местным введением второй композиции с целью подтягивания адоптивных (а затем бустированных) клеток к локальному участку (например, в опухоль).

Раковые опухоли

[0051] Схемы "прайм-пулл", описанные в настоящем документе, могут быть пригодны для лечения различных видов рака. В одном варианте реализации изобретения способы, описанные в настоящем

документе, могут быть пригодны для лечения различных солидных опухолей, *т.е.* карцином, сарком и лимфом. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой первичную солидную опухоль, а в некоторых других вариантах реализации изобретения рак представляет собой метастатическую или вторичную солидную опухоль. В некоторых родственных вариантах реализации изобретения рак выбирается из меланомы, рака легкого, рака шейки матки, рака яичников, рака матки, рака молочной железы, рака печени, рака желудка, рака толстой кишки, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака почки, рака мочевого пузыря, рака мозга, фибросаркомы, миксосаркомы, липосаркомы, хондросаркомы, остеогенной саркомы, хордомы, ангиосаркомы, эндотелиосаркомы, лимфангиосаркомыа, псевдомиксомы брюшины, лимфангиоэндотелиосаркомы, синовиомы, мезотелиомы, опухоли Юинга, леймиосаркомы, рабдомиосаркомы, карциномы толстой кишки, рака поджелудочной железы, плоскоклеточной карциномы, базально-клеточной карциномы, аденокарциномы, карциномы с клеток Меркеля, карциномы потовых желез, карциномы сальных желез, папиллярной карциномы, папиллярной аденокарциномы, цистаденокарциномы, медуллярной карциномы, бронхогенной карциномы, почечно-клеточный карциномы, гепатомы, карциномы желчных протоков, хориокарциномы, семиномы, эмбриональной карциномы и опухоли Вильмса. В некоторых других родственных вариантах реализации изобретения раковая клетка берет свое начало из рака, который выбирается из тестикулярной опухоли, карциномы легкого, мелкоклеточной карциномы легкого, карциномы мочевого пузыря, эпителиальной карциномы, глиомы, глиобластомы, астроцитомы, плазмоцитомы, медуллобластомы, краниофарингиомы, эпендимомы, пинеаломы, гемангиобластомы, невриномы слухового нерва, олиодендроглиомы, менингиомы, меланомы, нейробластомы, ретинобластомы, лейкоза, лимфомы, неходжкинской лимфомы, множественной миеломы, макроглобулинемии Вальденстрема или других видов рака. Таким образом, описанные в настоящем документе способы включают способы лечения, облегчения симптомов и ингибирования метастазов рака, включающие введение "прайм-пулл" иммунизации, причем первая "прайм"-композиция, или в некоторых вариантах реализации

изобретения, "прайм/буст"- композиция содержит, например, рекомбинантный экспрессионный вектор, экспрессирующий специфический иммуноген (например, один или более опухолеассоциированных антигенов), и "пулл"-композицию, содержащую агонист TLR, такой как GLA, с целью привлечения иммунных клеток в опухоль.

[0052] В некоторых вариантах реализации изобретения схемы "прайм-пулл", описанные в настоящем документе, пригодны для лечения раковых заболеваний, в которых опухоли проявляют особенную иммуногенность, и в которых опухоли являются доступными, таких как, но не ограничиваясь ими, меланома, карцинома из клеток Меркеля (MCC), рак шейки матки, раковые заболевания головы и шеи, рак мочевого пузыря, саркомы и рак пищевода. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенность может быть определена на основе мутационной гетерогенности и/или экспрессии антигенов рака семенников и/или экспрессии вирусных антигенов (например, вакцинальный принцип специфического антигена/нео-антигена). См., к примеру, Chen et al., Cancer Immunol Res. 2014 May;2(5):480-6; и Lawrence et al., 2013 Nature 499:214-218.

[0053] В конкретных вариантах реализации изобретения вирус-индуцированный рак поддается лечению или ослаблению с помощью способов, описанных в настоящем документе. Многочисленные виды рака, вызываемые онкогенными вирусами, известны в данной области техники. Типичные вирус-индуцированные раковые заболевания которые можно лечить или облегчить с использованием способов, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, рак мочевого пузыря, карциному из клеток Меркеля, саркому Капоши, рак печени, лимфому Беркитта, неходжкинскую лимфому, посттрансплантационный лимфопролиферативный синдром, рак носоглотки, рак шейки матки, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярную карциному и Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых (см. например, Mesri et al., Cell Host & Microbe 15:266-282). Другие виды рака могут быть определены как индуцируемые определенными вирусами, известными и неизвестными. Раковые заболевания, которые не индуцируются онкогенными вирусами, могут быть также пролечены с

использованием способов "прайм-пулл", описанных в настоящем документе.

Рак мочевого пузыря

[0054] Недавние исследования показали, что рак мочевого пузыря связан с герпесвирусом, ассоциированным с саркомой Капоши (KSHV); KSHV, также известный как человеческий герпесвирус 8. В частности, ДНК KSHV была обнаружена у 55% пациентов. (M. Paradžik et al., Tumor Biology, 2014, 35(1), pp 567-572). БЦЖ индуцирует сильную врожденную и воспалительную реакцию в слизистой оболочке мочевого пузыря, что измеряется высвобождением цитокинов и инфильтрацией нейтрофилами и Т-клетками. Продемонстрировано, что в организме человека внутрипузырное применение БЦЖ приводит к индукции большого количества провоспалительных цитокинов и хемокинов, таких как IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF-α, IFN-γ и GM-CSF (Kitamura, H., и Tsukamoto, T., Cancers (3): 3055-3072 (2011), и Agarwal, A., et al., Immunopharmacol Immunotoxicol 32(2): 384-356 (2010)). У мышей БЦЖ существенно повышающе регулировала гены для хемокинов (Cxcl2, CXCL9, CXCL10, Xcl1) Т-хелперов типа 1 (Th1), повышала экспрессию хемокинов Th1/Th2 (RANTES, Ccl6 и Ccl7) и Th1-поляризующих цитокинов (IL-1ß и TNF-α), и генов Fc γ -R1 и iNOS уже после четырех еженедельных инстилляций. Большинство из этих генов характеризовались высоким уровнем экспрессии по истечении 6 недель (Seow, S.W., et al., Immunology. 2008 Jul;124(3):419-27 (2008)). Дополнительное описание использования БЦЖ в качестве противоопухолевого агента можно найти, например, в патенте США № 5712123, который включен в данный документ посредством ссылки.

[0055] GLA индуцирует сильные цитокин/хемокиновые ответы в PBMC мышей in vitro, включая хемокины для Т-клеток TH1-типа (CXCL9 и CXCL10) и мононуклеарных лейкоцитов (CCL2, CCL3), а также MCP-1, TNFa, IFNc и IP-10 (Lambert, S.L., et al., PLoS One; 7(12) 2012)).

[0056] GLA, наносимый на слизистую оболочку с рекомбинантным белком, индуцирует как местные, так и системные специфические антительные ответы и специфические системные

клетки CD4, в особенности фенотипа Th17, а также некоторые клетки CD8 (Arias, M.A., et al., PLoS One. 2012;7(7):e41144 (2012)).

[0057] Проникающие в опухоль лимфоциты (TIL) были идентифицированы как независимый прогностический фактор при раке мочевого пузыря в начале 1978 года, и показано, что TIL CD8 могут прогнозировать выживаемость при карциноме с прорастанием в мышечный слой (Mostofi, F.K., and Sesterhenn, I., Natl Cancer Inst Monogr; 49: 133-141 (1978); Lopez-Beltran, a. et al., Urol Int; 44: 205-209 (1989); Morita, t., et al., Cancer Immunol Immunother; 32: 191-194 (1990); Ikemoto, S., et al., Br J Urol; 65: 333-338 (1990); Lipponen, P.K., et al., Eur J Cancer; 29: 69-75 (1993); and Sharma, P., et al., Proc Natl Acad Sci U S A., Mar 6;104(10):3967-72 (2007)). Важно то, что как клетки CD4, так и CD8 необходимы для БЦЖ-опосредованной противоопухолевой активности, а преимущественный Th1-иммунный ответ ассоциирован с эффективной БЦЖ-терапией, в то время как Th2-ответ, как представляется, ассоциирован с неэффективностью (Ratliff, T.L., et al., J Urol; 150:1018-23 (1993); Riemensberger, J., et al., Clin Exp Immunol; 127:20-6 (2002); Saint, f. et al., J Urol; 167:364-7 (2002); de Reijke, t.M., et al. J Urol; 155:477-82 (1996); Nadler, R., et al.,. Clin Exp Immunol; 131:206-16 (2003), Luo, Y., et al., Cytokine; 21:17-26 (2003); и Bockholt, N.A., et al., J Urol; 187:2228-35 (2012)). Дендритные клетки (CD1a+, CD1) были также обнаружены в переходно-клеточном раке мочевого пузыря, тем не менее, они экспрессировали классические маркеры активации только на низком уровне (Troy, A.J., et al., J Urol., Jun;161(6):1962-7 (1999)).

[0058] Обнаружено, что антигены рака семенников (CTA) NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10 и GAGE экспрессируются раковыми заболеваниями мочевого пузыря, причем по меньшей мере один CTA экспрессируется в 77% образцов и два CTA экспрессируются в 61% опухолей (Sharma, P., et al., Cancer Immun., Dec 18;3:19 (2003); и Sharma, P., et al., Clin Cancer Res., Sep 15;12(18):5442-7 (2006)). Важно отметить, что исследование 69 пациентов с урогенитальной карциномой на наличие

внутриопухолевых Т-клеток CD8, экспрессии антигена класса I MHC и экспрессии NY-ESO-1, показало, что у пациентов на поздних стадиях рака и более высокими количествами CD8 TIL отмечалась выше выживаемость без признаков заболевания (p <0,001) и общая выживаемость (P=0,018) по сравнению с пациентами с раком аналогичной стадии и меньшим количеством CD8 TIL (Sharma, P., et al., Clin Cancer Res., Sep 15;12(18):5442-7 (2006)).

[0059] При внутрикожной иммунизации рекомбинантным NY-ESO-1 с адъювантом GM-CSF и БЦЖ у шести из шести и одного из шести пациентов с раком мочевого пузыря, экспрессирующим NY-ESO-1, отмечались ответы CD4 и CD8, соответственно (Sharma, P., et al., J Immunother., Nov-Dec;31(9):849-57 92008)).

[0060] У мышей хоуминг антиген-специфических CD8 Т-клеток в мочевой пузырь, приводящий к регрессии опухоли, может быть индуцирован как подкожной, так и интраназальной иммунизацией CpG-адъювантными пептидами (Domingos-Pereira, S., et al., J Urol., Aug 13, 5347(13)05123-9 (2013)). Тем не менее, на мышах также было показано, что подкожная иммунизация с последующим местным применением хемокинов CXCL9 и CXCL10 на слизистую оболочку генитального тракта приводила к привлечению активированных CD8 Т-клеток и формированию пула Т-клеток памяти в указанной анатомической локализации; для данного типа иммунизации авторами был предложен термин "прайм-пулл" (Shin, H., et al., Nature, Nov 15;491(7424):463-7 (2012)). Таким образом, было продемонстрировано, что как импринтинг посредством иммунизации, так и местное действие хемокинов, могут привести к привлечению активированных CD8 Т-клеток на слизистую оболочку мочевого пузыря.

Рекомбинантные экспрессионные векторы

[0061] В одном варианте реализации изобретения предлагаются рекомбинантные экспрессионные векторы, которые включают полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один иммуноген, индуцирующий иммунный ответ на иммуноген. С целью получения эффективной транскрипции и трансляции иммуногена, кодирующие полинуклеотидные последовательности в каждом векторе должны включать по меньшей мере одну

соответствующую последовательность контроля экспресии (также называемую последовательностью, регулирующей экспрессию, или характеристикой) (например, промотор, энхансер, лидер), которые описаны в настоящем документе более подробно, и являются функционально связанными с кодирующей полинуклеотидной последовательность (последовательностями). Таким образом, эти рекомбинантные экспрессионные векторы предлагаются для направления экспрессии иммуногена или для направления коэкспрессии по меньшей мере двух иммуногенов в любой подходящей клетке-хозяине, которая была трансформирована, трансдукцирована или трансфицирована с помощью рекомбинантного экспрессионного вектора, либо в которую рекомбинантный экспрессионный вектор, содержащий векторную частицу, был введен.

[0062] Рекомбинантные экспрессионные векторы, описанные в данном документе, могут кодировать один или более иммуногенов (т.е. по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три иммуногена и т.д.), которые описаны более подробно в настоящем документе. В конкретных вариантах реализации изобретения по меньшей мере один, два, или три, или более иммуногенов из онкогенного вируса (например, EBV, HPV, HBV, HCV, HTLV и KSHV) могут быть закодированы с помощью рекомбинантного экспрессионного вектора. Типичные иммуногены представляют собой антигены онкогенных вирусов, включая, но не ограничиваясь ими, EBV: EBNA-1, LMP-1, LMP-2A; HPV: E6, E7, E5; HBV: HBx, большой, средний, малый S антигены; HCV: Core, NS3, Ns5A; HTLV: Tax, HBZ; KSHV: vFLIP, LANA, vGPCR, vIRF-1; вирус полиомы Меркеля: большой T-антиген; hCMV: pp65, IE1, US28. В другом конкретном варианте реализации изобретения рекомбинантный экспрессионный вектор, описанный в данном документе, может кодировать по меньшей мере один, два, три или более опухолеассоциированных антигенов. Эти опухолеассоциированные антигены описаны более подробно в настоящем документе, и могут быть, например, опухолеассоциированным антигеном из антигена рака мочевого пузыря, антигеном карциномы из клеток Меркеля, антигеном почечно-клеточной карциномы, антигеном рака простаты (например, фосфатаза простатической кислоты, простат-специфический антиген,

NKX3.1 и простат-специфический мембранный антиген), антигеном мезотелиомы, антигеном рака поджелудочной железы, антигеном меланомы, антигеном рака молочной железы, антигеном колоректального рака, антигеном рака легкого, антигеном рака яичника или антигеном, ассоциированным с любым раком или опухолью, описанным в данном документе и известным в данной области техники.

[0063] Рекомбинантные экспрессионные векторы могут быть использованы для экспрессии какого-либо одного или более иммуногенов, описанных в настоящем документе. В конкретных вариантах реализации изобретения рекомбинантный экспрессионный вектор доставляется в соответствующую клетку (например, антиген-представляющую клетку, т.е. клетку, которая на своей клеточной поверхности представляет комплекс пептид/MHC, такую как дендритная клетка) или ткань (например, лимфоидная ткань), которые будут индуцировать желаемый иммунный ответ (т.е. специфический гуморальный ответ (то есть B-клеточный ответ) и/или индукцию специфического клеточно-опосредованного иммунного ответа, который может включать иммуноген-специфическии CTL-ответ). Следовательно, рекомбинантные экспрессионные векторы могут также включать, например, лимфоидные тканеспецифические транскрипционные регуляторные элементы (TRE), такие как B-лимфоцит, T-лимфоцит или TRE, специфические к дендритным клеткам. Лимфоидные тканеспецифические TRE известны в данной области техники (см., например, Thompson et al. (1992), Mol. Cell. Biol. 12, 1043-1053; Todd et al. (1993), J. Exp. Med. 177, 1663-1674; Penix et al. (1993), J. Exp. Med. 178, 1483-1496).

[0064] В конкретном варианте реализации изобретения рекомбинантный экспрессионный вектор представляет собой плазмидную ДНК или космидную ДНК. Плазмидная ДНК или космидная ДНК, содержащая один или более полинуклеотидов, кодирующих иммуноген, как описано в данном документе, легко конструируется с использованием стандартных методик, хорошо известных в данной области техники. Как правило, вектор может быть сконструирован в форме плазмиды, которая затем может быть трансфицирована в пакующую клеточную линию или клеточную линию-продуцент.

Плазмида, как правило, содержит последовательности, пригодные для репликации плазмиды в бактерии. Такие плазмиды хорошо известны в данной области техники. Кроме того, векторы, которые включают прокариотический источник репликации, могут также включать ген, экспрессия которого обеспечивает детектируемый или селектируемый маркер, такой как маркер лекарственной устойчивости. Типичными продуктами устойчивости к антибактериальным средствам являются те, которые придают устойчивость к ампициллину или тетрациклину. Для анализа с целью подтверждения того, что в плазмиду включены правильные нуклеотидные последовательности, плазмида может быть реплицирована в E.coli, очищена и проанализирована с помощью расщепления рестрикционной эндонуклеазой и/или ее нуклеотидной последовательностью, определенной с использованием обычных способов.

[0065] В других конкретных вариантах реализации изобретения рекомбинантный экспрессионный вектор представляет собой вирусный вектор. Типичные рекомбинантные экспрессионные вирусные векторы включают ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, поксвирусный вектор, вектор вируса осповакцины, аденовирусный вектор, вектор вируса, ассоциированного с аденовирусом, герпесвирусный вектор, альфа-вирусный вектор. Вирусные векторы могут быть живыми, аттенуированными, с зависимой от условий репликацией или дефектными по репликации, и, как правило, являются непатогенными (дефектными), компетентными к репликации вирусными векторами.

[0066] В качестве примера, в конкретном варианте реализации изобретения, когда вирусный вектор содержит вектор вируса осповакцины, полинуклеотид, кодирующий иммуноген, представляющий интерес, может быть вставлен в несущественный сайт генома вектора вируса осповакцины. Такие несущественные сайты описаны, например, в Perkus et al., Virology 152:285 (1986); Hruby et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3411 (1983); Weir et al., J. Virol. 46:530 (1983)). Пригодные промоторы для использования с вирусами осповакцины, включают, но не ограничиваются ими, P7.5 (см, например, Cochran et al., J. Virol. 54:30 (1985); P11 (см.,

например, Bertholet, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:2096 (1985)); и CAE-1 (см., например, Patel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9431 (1988)). Сильно аттенуированные штаммы вируса осповакцины являются более приемлемыми для использования в организме человека и включают Lister, NYVAC, которые содержат специфические делеции генома (см., например, Guerra et al., J. Virol. 80:985-98 (2006); Tartaglia et al., AIDS Research and Human Retroviruses 8:1445-47 (1992)), или MVA (см., например, Gheradi et al., J. Gen. Virol. 86:2925-36 (2005); Mayr et al., Infection 3:6-14 (1975)). См. также Hu et al. (J. Virol. 75:10300-308 (2001), описывающий использование вируса болезни Ябы в качестве вектора для терапии рака); патенты США №№ 5698530 и 6998252. См. также, например, США № 5443964. См. также патенты США №№ 7247615 и 7368116.

[0067] В некоторых вариантах реализации изобретения аденовирусный вектор или вектор вируса, ассоциированного с аденовирусом, может быть использован для экспрессии иммуногена, представляющего интерес. Некоторые системы аденовирусного вектора и способы введения векторов были описаны (см., например, Molin et al., J. Virol. 72:8358-61 (1998); Narumi et al., Am J. Respir. Cell Mol. Biol. 19:936-41 (1998); Mercier et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:6188-93 (2004); патенты США №№ 6143290; 6596535; 6855317; 6936257; 7125717; 7378087; 7550296).

[0068] Ретровирусные векторы могут включать те, которые разработаны на основе вируса лейкоза мышей (MuLV), вируса лейкоза гиббонов (GaLV), экотропных ретровирусов, вируса иммунодефицита обезьян (SIV), вируса иммунодефицита человека (HIV), а также комбинации (см, например, Buchscher et al., J. Virol. 66:2731-39 (1992); Johann et al., J. Virol. 66:1635-40 (1992); Sommerfelt et al., Virology 176:58-59 (1990); Wilson et al., J. Virol. 63:2374-78 (1989); Miller et al., J. Virol. 65:2220-24 (1991); Miller et al., Mol. Cell Biol. 10:4239 (1990); Kolberg, NIH Res. 4:43 1992; Cornetta et al., Hum. Gene Ther. 2:215 (1991)).

[0069] В более конкретных вариантах реализации изобретения рекомбинантный экспрессионный вектор представляет собой вирусный

вектор. В некоторых вариантах реализации изобретения вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор, и в другом варианте реализации изобретения ретровирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор. Как будет понятно специалистам в данной области техники, вирусный вектор, такой как лентивирусный вектор, как правило, относится к частице вирусного вектора, которая содержит геном вирусного вектора. Например, частица лентивирусного вектора может содержать геном лентивирусного вектора. Что касается лентивирусных векторов, векторный геном может быть получен из любого из большого количества пригодных, доступных лентивирусных векторов на основе генома, включая те, которые определены для применения в генной терапии человека (см., например, Pfeifer et al., Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2:177-211 (2001)). Пригодные геномы лентивирусных векторов включают те, которые получены на основе вируса иммунодефицита человека (HIV-1), HIV-2, кошачем вирусе иммунодефицита (FIV), вирусе инфекционной анемии лошадей, вирусе иммунодефицита обезьян (SIV), и вирусе маеди/висна. Желаемая характеристика лентивирусов состоит в том, чтобы они были способны инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, хотя клетки-мишени не должны быть делящимися клетками или стимулироваться к делению. Как правило, гликопротеины генома и оболочки будут исходить из различных вирусов, таких, которые получены в результате псевдотипирования частицы вирусного вектора. Характеристики безопасности вирусного вектора являются желательными для включения. Характеристики безопасности включают самоинактивирующийся LTR и неспособность к интеграции, как описано более подробно в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения неспособность к интеграции может быть придана элементами векторного генома, но может также происходить из элементов системы упаковки (например, нефункциональный интегразный белок, который не может быть частью векторного генома, но поставляется при перенесении). Типичные векторы содержат сигнал упаковки (psi), Rev-адаптивный элемент (RRE), донор сплайсированного фрагмента, акцептор сплайсированного фрагмента, необязательно - центральный

полипуриновый тракт (cPPT) и WPRE-элемент. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения геном вирусного вектора включает последовательности из лентивирусного генома, такого как геном HIV-1 или геном SIV. Конструкция вирусного генома может содержать последовательности из 5 'и 3'-LTR лентивируса, и, в частности, может включать последовательности R и U5 из 5'-LTR лентивируса и инактивированный или самоинактивирующийся 3' LTR из лентивируса. Последовательности LTR могут быть последовательностями LTR из любого лентивируса из любого вида. Например, это могут быть последовательности LTR из HIV, SIV, FIV или BIV. Как правило, последовательности LTR представляют собой последовательности HIV LTR.

[0070] Векторный геном может содержать инактивированный или самоинактивирующийся 3' LTR (см., например, Zufferey et al., J. Virol. 72: 9873, 1998; Miyoshi et al., J. Virol. 72: 8150, 1998; оба из которых включены в данное описание в полном объеме). Самоинактивирующийся вектор, как правило, имеет делецию энхансерной и промоторной последовательностей из 3' длинного концевого повтора (LTR), который скопирован в 5' LTR в процессе векторной интеграции. В одном случае U3-элемент 3' LTR содержит делецию своей энхансерной последовательности, сайтов TATA-бокс, Sp1 и NF-каппа B. В результате самоинактивации 3' LTR, провирус, который генерируется следующим элементом и обратной транскрипцией, будет включать инактивированный 5' LTR. Обоснованием является повышение безопасности за счет снижения риска мобилизации векторного генома и влияния LTR на ближайшие клеточные промоторы. Самоинактивирующийся 3' LTR может быть сконструирован любым способом, известным в данной области техники.

[0071] Необязательно последовательность U3 из лентивирусного 5' LTR может быть заменена в вирусной конструкции промоторной последовательностью, такой как гетерологичная промоторная последовательность. Это может повысить титр вируса, выделенного из пакующей клеточной линии. Энхансерная последовательность также может быть включена. Может быть использована любая комбинация энхансер/промотор, которая

повышает экспрессию генома вирусной РНК в пакующей клеточной линии. В одном примере используется энхансерная/промоторная последовательность CMV (см., например, патенты США №№ 5385839 и 5168062).

[0072] В некоторых вариантах реализации изобретения риск инсерционного мутагенеза минимизируется путем конструкции лентивирусного вектора, направленной на дефективную интеграцию. С целью получения неинтегрирующего векторного генома могут применяться разнообразные подходы. Эти подходы предусматривают использование мутации (мутаций) в компоненте фермента интегразы гена pol, вследствие чего он кодирует белок с неактивной интегразой. Сам векторный геном может быть модифицирован с целью предотвращения интеграции путем, например, мутации или делеции одного или обоих сайтов прикрепления, или делая 3' LTR-проксимальный полипуриновый тракт (PPT) нефункциональным путем делеции или модификации. Кроме того, доступны негенетические подходы; они включают фармакологические средства, которые ингибируют одну или более функций интегразы. Подходы не исключают друг друга, то есть одновременно может применяться более одного. Например, как интеграза, так и сайты прикрепления могут быть нефункциональными, или интеграза и сайт PPT могут быть нефункциональнымы, или сайты прикрепления и PTT-сайт могут быть нефункциональными, или все они могут быть нефункциональными.

[0073] Интеграза участвует в расщеплении вирусной двухнитевой ДНК с тупыми концами и соединения концов с 5'-фосфатами в двух нитях хромосомного сайта-мишени. Интеграза имеет три функциональных домена: N-концевой домен, который содержит цинк-связывающий мотив (HHCC); центральное ядро домена, который содержит каталитическое ядро и консервативный мотив DD35E (D64, D116, E152 в HIV-1); и C-концевой домен, который имеет ДНК-связывающие свойства. Точечных мутаций, введенных в интегразу, достаточно для нарушения нормального функционирования. Многие мутации интегразы сконструированы и охарактеризованы (см., например, Philpott and Thrasher, Human Gene Therapy 18:483, 2007; Apolonia, Thesis submitted to

University College London, April 2009, pp, 82-97; Engelman et al., J. Virol. 69: 2729, 1995; Nightingale et al., Mol. Therapy, 13: 1121, 2006). Последовательность, кодирующая белок интегразы, может быть удалена или мутирована для визуализации неактивности белка, предпочтительно без существенного ухудшения активности обратной транскриптазы или ядерного нацеливания, тем самым предотвращая только интеграцию провируса в геном клетки-мишени. Приемлемые мутации могут ослабить катализ интегразы, перенос цепи, связывание с att-сайтами, связывание с хромосомной ДНК хозяина и другие функции. Например, замещение аспарагина на единичную аспарагиновую кислоту в остатке 35 интегразы HIV или SIV полностью блокирует интеграцию вирусной ДНК. Делеции интегразы, как правило, ограничиваются к С-концевому домену. Делеция кодирующей последовательности для остатков 235-288 дает в результате пригодную нефункциональную интегразу (см., например, Engelman et al., J. Virol. 69:2729, 1995). В качестве дополнительных примеров, мутации могут быть получены, например, для Asp64 (количества остатков приведены для HIV-1, что соответствует количеству остатков для интегразы из других лентивирусов или ретровирусов и могут быть легко определены обычным специалистом) (например, D64E, D64V), Asp116 (например, D116N), Asn120 (например, N120K), Glu152, Gln148 (например, Q148A), Lys156, Lys159, Trp235 (например, W235E), Lys264 (например, K264R), Lys266 (например, K266R), Lys273 (например, K273R). Другие мутации могут быть сконструированы и проанализированы на интеграцию, трансгенную экспрессию и любой другой желательный параметр. Анализы для этих функций хорошо известны. Мутации могут быть получены с использованием любого из множества способов, в том числе сайт-направленного мутагенеза и химического синтеза последовательности нуклеиновых кислот. Одна мутация может быть получена или более чем одна из этих мутаций может присутствовать в интегразе. Например, интеграза может иметь мутации в двух аминокислотах, трех аминокислотах, четырех аминокислотах и так далее.

[0074] В альтернативном варианте или в комбинации с использованием мутанта(ов) интегразы сайты прикрепления (att) в

U3 и U5 могут быть также мутированы. Интеграза связывается с этими сайтами, а 3'-концевой динуклеотид расщепляется на обоих концах векторного генома. Динуклеотид A CA расположен в рецессированном 3' конце; CA необходим для процессинга, мутация нуклеотидов блокирует интеграцию в хромосому хозяина. Фрагмент A динуклеотида CA является наиболее важным нуклеотидом для интеграции, а мутации в обоих концах генома дадут лучшие результаты (см., например, Brown et al., J. Virol. 73:9011 (1999)). В одном из иллюстративных примеров CA на каждом конце изменяется на TG. В других иллюстративных примерах, CA на каждом конце изменяется на TG на одном конце и на GT на другом конце. В других иллюстративных примерах CA на каждом конце удаляется; в других иллюстративных примерах фрагмент A из CA удаляется на каждом конце.

[0075] Интеграция также может быть ингибирована с помощью мутации или делеции полипуринового тракта (PPT) (см., например, WO 2009/076524), расположенного проксимальнее 3' LTR. PPT представляет собой полипуриновую последовательность из около 15 нуклеотидов, которые могут служить в качестве праймерного сайта связывания для синтеза "плюс-нить" ДНК. В этом случае мутации или делеции PPT нацелены на процесс обратной транскрипции. Без привязки к конкретному механизму, в результате мутации или делеции PPT, продукция линейной ДНК радикально снижается, и, по существу, продуцируются только круги 1-LTR ДНК. Для интеграции необходим векторный геном линейной двухнитевой ДНК, а без него интеграция по сути устраняется. Как указано в настоящем описании, PPT может быть нефункциональным в результате мутации или делеции. Как правило, весь PPT, состоящий из около 15 нт, удаляется, хотя в некоторых вариантах реализации изобретения могут быть осуществлены более короткие делеции из 14 нт, 13, нт, 12 нт, 11 нт, 10 нт, 9 нт, 8 нт, 7 нт, 6 нт, 5 нт, 4 нт, 3 нт и 2 нт. Когда мутации осуществлены, как правило, это множественные мутации, особенно в 5' половине PT (см., например, McWilliams et al., J. Virol. 77:11150, 2003), хотя одиночные и двойные мутации в первых четырех основаниях все еще ослабляют транскрипцию. Мутации, сделанные на 3' конце PPT, как правило, имеют более

сильное действие (см., например, Powell et al., J. Virol. 70:5288, 1996).

[0076] Эти различные подходы к получению неинтегрирующего векторного генома могут быть использованы по отдельности или в комбинации. Применение более чем одного подхода может быть необходимо для построения надежного вектора посредством дублирующих механизмов. Таким образом, мутации или делеции PPT могут быть объединены с мутациями или делециями сайта att, или мутациями интегразы, или мутации или делеции PPT могут быть объединены как с мутациями или делециями сайта att, так и с мутациями интегразы. Аналогичным образом, мутации или делеции сайта att и мутации интегразы могут быть объединены друг с другом или с мутациями или делециями PPT.

[0077] Как описано в настоящем документе, лентивирусные векторные конструкции содержат промотор для экспрессии в клетках млекопитающих. Промоторы, которые обсуждаются более подробно в настоящем документе, включают, например, промотор человеческого убиквитина C (UbiC), предранний промотор цитомегаловируса (CMV), и промотор вируса саркомы Рауса (RSV). Область U3 может содержать последовательность PPT (полипуриновый тракт), расположенную непосредственно против хода транскрипции. В некоторых конкретных вариантах реализации изобретения любая из по меньшей мере трех различных областей U3 (на 3'-конце) может быть включена в лентивирусный вектор (см. SEQ ID NO: 21-23). Конструкции содержат делеции в областях U3. Конструкция SIN имеет делецию из около 130 нуклеотидов в U3 (см., например, Miyoshi, et al. J. Virol. 72: 8150, 1998; Yu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3194, 1986), которая удаляет TATA-бокс, тем самым упраздняя активность промотора LTR. Делеции в конструкциях 703 и 704 усиливают экспрессию из лентивирусных векторов (см., например, Bayer et al., Mol. Therapy 16: 1968, 2008). Кроме того, конструкция 704 содержит делецию 3' PPT, которая ослабляет интеграцию вектора (см., например, WO 2009/076524). См. также заявку на патент США № 12/842609 и международную заявку на патент № PCT/US10/042870, которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

Последовательности, регулирующие экспрессию

[0078] Согласно настоящему описанию рекомбинантный экспрессионный вектор содержит по меньшей мере одну регулирующую экспрессию последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения, когда рекомбинантный экспрессионный вектор содержит геном вирусного вектора, экспрессия по меньшей мере одного иммуногена, особенно клеток-мишеней, является желаемой. Как правило, например, в лентивирусном векторе полинуклеотидная последовательность, кодирующая иммуноген, находится между 5' LTR- и 3' LTR-последовательностями. В дополнение к этому, последовательность (последовательности), кодирующая нуклеотид, является предпочтительно функционально связанной в функциональной взаимосвязи с другими генетическими или регулирующими последовательностями или признаками, для типичных последовательностей, регулирующих транскрипцию, включая промоторы или энхансеры, которые регулируют экспрессию иммуногена в той или иной способ. В некоторых случаях пригодные последовательности, регулирующие транскрипцию, являются теми, которые в значительной степени регулируются в отношении активности, как во времени, так и в пространстве. Элементы, контролирующие экспрессию, которые могут быть использованы для регуляции экспрессии кодируемых полипептидов, известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, индуцируемые промоторы, конститутивные промоторы, сигналы секреции, энхансеры и другие регулирующие последовательности.

[0079] Полинуклеотид, кодирующий иммуноген и любая другая экспрессируемая последовательность, как правило, находятся в функциональной связи с внутренними промотор/энхансерными регулирующими последовательностями. Что касается лентивирусных векторных конструкций, "внутренний" промотор/энхансер является таким, который расположен между 5' LTR и 3' LTR-последовательностями в вирусном векторе и функционально связан с кодирующей полинуклеотид последовательностью, представляющей интерес. Внутренний промотор/энхансер может быть промотором, энхансером или комбинацией промотор/энхансер, известными своим повышением экспрессии гена, с которым они находятся в

функциональной зависимости. Термин "функциональная зависимость" и "функционально связанный" означает, без ограничения, что последовательность находится в правильном положении и ориентации по отношению к промотору и/или энхансеру, в результате чего последовательность, представляющая интерес, будет экспрессироваться, когда промотор и/или энхансер вводят в контакт с соответствующими молекулами.

[0080] Выбор внутреннего промотора/энхансера основывается на желаемом паттерне экспрессии иммуногена и на специфических свойствах известных промоторов/энхансеров. Таким образом, внутренний промотор может быть конститутивно активным. Не ограничивающие примеры конститутивных промоторов, которые могут быть использованы, включают промотор убиквитина (см., например, США № 5510474; WO 98/32869); CMV (см., например, Thomsen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:659, 1984; патент США № 5168062); бета-актин (Gunning et al. 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4831-4835); и pgk (см., например, Adra et al. 1987 Gene 60:65-74; Singer-Sam et al. 1984 Gene 32:409-417; и Dobson et al. 1982 Nucleic Acids Res. 10:2635-2637).

[0081] В альтернативном варианте промотор может представлять собой тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах реализации изобретения промотор представляет собой промотор, специфический к клетке-мишени. Например, промотор может быть из любого продукта, экспрессированного дендритными клетками, включая CD11c, CD103, TLRs, DC-SIGN, BDCA-3, DEC-205, DCIR2, рецептор маннозы, Dectin-1, Clec9A, MHC класса II. Кроме того, промоторы могут быть выбраны для обеспечения индуцируемой экспрессии иммуногена. В данной области техники для индуцируемой экспрессии известны множество систем, включая тетрациклиновую систему ответа, систему lac оператор-репрессор, а также промоторы, отвечающие на разнообразные физиологические изменения и изменения внешней среды, включая тепловой шок, ионы металлов, такие как металлотионеиновый промотор, интерфероны, гипоксию, стероиды, такие как промотор прогестеронового или глюкокортикоидного рецептора, радиацию, такие как промотор VEGF. Комбинация промоторов также может быть использована для

получения желаемой экспрессии каждого из иммуногенов, кодирующих полинуклеотидные последовательности. Специалист с обычной квалификацией сможет выбрать промотор на основании требуемого паттерна экспрессии полинуклеотидной последовательности в организме или клетке-мишени, представляющей интерес.

[0082] Рекомбинантный экспрессионный вектор, включая геном вирусного вектора, может содержать по меньшей мере один реагирующий промотор РНК-полимеразы II или III. Этот промотор может быть функционально связан с полинуклеотидной последовательностью, представляющей интерес, а также может быть связан с терминирующей последовательностью. Кроме того, может быть включен более чем один промотор РНК-полимеразы II или III. Промоторы РНК-полимеразы II и III хорошо известны специалистам в данной области техники. Пригодный диапазон промоторов РНК-полимеразы III можно найти, например, в Paule и White, Nucleic Acids Res., Vol. 28, pp 1283-1298 (2000). Промоторы РНК-полимеразы II или III могут также включать любой синтетический или сконструированный ДНК-фрагмент, который может направлять РНК-полимеразу II или III для транскрибирования по ходу транскрипции последовательности, кодирующей РНК. Кроме того, промотор или промоторы РНК-полимеразы II или III (Pol II или III), используемые как часть генома вирусного вектора, могут быть индуцируемыми. Любой пригодный индуцируемый промотор Pol II или III может быть использован с помощью способов, описанных в настоящем документе. Особенно пригодны промоторы Pol II или III включают тетрациклиновые реагирующие промоторы, представленные в Ohkawa и Taira, Human Gene Therapy, Vol. 11, pp 577-585 (2000) и в Meissner et al., Nucleic Acids Research, Vol. 29, pp 1672-1682 (2001).

[0083] Внутренний энхансер может также присутствовать в рекомбинантном экспрессионном векторе, включая геном вирусного вектора, для усиления экспрессии полинуклеотидной последовательности, представляющей интерес. Например, может быть использован энхансер CMV (см., например, Boshart et al., Cell 41:521, 1985). Многие энхансеры в вирусных геномах, таких как HIV, CMV, и в геномах млекопитающих были идентифицированы и

охарактеризованы (см., например, базы данных общего пользования, такие как GenBank). Энхансер может использоваться в комбинации с гетерологичным промотором. Обычный специалист в данной области техники сможет выбрать соответствующий энхансер на основании желаемого паттерна экспрессии.

[0084] При нацеленной доставке рекомбинантного экспрессионного вектора, включая геном вирусного вектора, к определенной клетке-мишени, геном вектора, как правило, будет содержать промотор, который распознается клеткой-мишенью и который функционально связан с последовательностью, представляющей интерес, вирусными компонентами (когда вектор представляет собой вирусный вектор), и другими последовательностями, обсуждаемыми в настоящем документе. Промотор представляет собой элемент контроля экспрессии, образованный последовательностью нуклеиновой кислоты, которая обеспечивает осуществление связывания РНК-полимеразы и транскрипции. Промоторы могут быть индуцируемыми, конститутивными, временно активными или тканеспецифическими. Активность индуцируемых промоторов индуцируется наличием или отсутствием биотических или абиотических факторов. Индуцируемые промоторы могут быть полезным инструментом в области генной инженерии, поскольку экспрессия генов, с которыми они функционально связаны, может быть включена или выключена на определенных стадиях развития организма, его продукции, или в определенной ткани. Индуцируемые промоторы могут быть сгруппированы как химически регулируемые промоторы и физически регулируемые промоторы. Типичные химически регулируемые промоторы включают, не не ограничиваются ими, спиртово-регулируемые промоторы (например, промотор гена алкогольдегидрогеназы I (alcA)), тетрациклин-регулируемые промоторы (например, тетрациклин- реагирующий промотор), стероид-регулируемый промотор (например, промотор на основе глюкокортикоидного рецептора (GR) крысы, промотор на основе эстрогенового рецептора (ER) человека, промотор на основе экдизонового рецептора моли и промоторы на основе надсемейства стероидного/ретиноидного/тироидного рецептора), металл-

регулируемые промоторы (например, промоторы на основе гена металлотионеина), а также связанные с патогенезом промоторы (например, промоторы на основе белка, связанного с патогеном (PR) арабидопсиса и кукурузы). Типичные физически регулируемые промоторы включают, но не ограничиваются ими, температурно регулируемые промоторы (например, промоторы теплового шока) и свето-регулируемые промоторы (например, соевый промотор SSU). Другие типичные промоторы описаны в других источниках, например, в патентах и опубликованных патентных заявках, которые могут быть идентифицированы с помощью функции поиска в базе данных ведомства Соединенных Штатов Америки по патентам и товарным знакам.

[0085] Специалист в данной области техники будет иметь возможность выбрать соответствующий промотор, учитывая конкретные обстоятельства. В данной области техники хорошо известны множество различных промоторов, как и способы функционального связывания промотора с полинуклеотидной последовательностью, которая должна быть экспрессирована. Как последовательности нативного промотора, так и многие гетерологичные промоторы могут быть использованы для направления экспрессии в пакующей клетке и клетке-мишени. Как правило, используются гетерологичные промоторы, поскольку они зачастую обеспечивают более эффективную транскрипцию и более высокую продукцию целевого белка по сравнению с нативным промотором.

[0086] Промотор может быть получен, например, из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус птичьей оспы, аденовируса, вируса папилломы крупного рогатого скота, вируса птичьей саркомы, цитомегаловируса, ретровируса, вируса гепатита B и вируса обезьян 40 (SV40). Промотор также может быть, например, гетерологичным промотором млекопитающих, например, актиновым промотором или иммуноглобулиновым промотором, промотором теплового шока или промотором, обычно ассоциированным с нативной последовательностью, при условии, что такие промоторы совместимы с клеткой-мишенью. В одном варианте реализации изобретения промотор представляет собой естественный вирусный промотор в вирусной системе экспрессии. В некоторых вариантах

реализации изобретения промотор представляет собой промотор, специфический к дендритной клетке. Промотор, специфический к дендритной клетке, может представлять собой, например, промотор CD11c.

[0087] Транскрипция может быть усилена путем вставки энхансерной последовательности в вектор(ы). Энхансеры, как правило, представляют собой цис-действующие элементы ДНК, обычно от около 10 до 300 п.н. в длину, которые действуют на промотор с целью усиления его транскрипции. Многие энхансерные последовательности в настоящее время получают из генов млекопитающих (глобин, эластаз, альбумин, альфа-фетопротеин и инсулин) и из вирусов эукариотических клеток. Примеры включают энхансер SV40 на глухой стороне сайта инициации репликации (100-270 п.н.), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на глухой стороне сайта инициации репликации и аденовирусные энхансеры. Энхансер может быть сплайсирован в вектор в положении 5 'или 3' к антиген-специфической полинуклеотидной последовательности, но предпочтительно располагается на сайте 5' от промотора.

[0088] Экспрессионные векторы могут также содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Эти последовательности часто встречаются в 5' и изредка в 3' нетранслируемых областях эукариотических или вирусных ДНК или кДНК, и хорошо известны в данной области техники.

[0089] Рекомбинантная экспрессионная конструкция, включающая геном вирусного вектора, может также содержать дополнительные генетические элементы. Типы элементов, которые могут быть включены в конструкцию, не ограничены каким-либо образом, и могут быть выбраны для достижения конкретного результата. Например, может быть включен сигнал, который облегчает проникновение в ядро рекомбинантногоэ кспрессионного вектора или вирусного генома в клетку-мишень. Примером такого сигнала является клапанный сигнал HIV-1. Могут быть включены дополнительные регуляторные последовательности, которые облегчают анализ свойств сайта провирусной интеграции в клетке-

мишени. Например, в конструкцию может быть включена амбер-супрессорная последовательность тРНК. Инсуляторная последовательность, например из куриного β- глобина, также может быть включена в конструкцию вирусного генома. Этот элемент снижает вероятность сайленсинга интегрированного провируса в клетке-мишени из-за эффекта метилирования и гетерохроматинизации. Кроме того, инсулятор может защитить внутренний энхансер, промотор и экзогенные полинуклеотидные последовательности от положительных или отрицательных позиционных эффектов окружающих ДНК в сайте интеграции на хромосоме. Кроме того, рекомбинантная конструкция, включающая геном вектора, может содержать один или более генетических элементов, предназначенных для усиления экспрессии представляющего интерес гена. Например, в конструкцию может быть помещен реагирующий элемент вируса гепатита сурка (WRE) (см., например, Zufferey et al. 1999. J. Virol. 74:3668-3681; Deglon et al., 2000. Hum. Gene Ther. 11:179-190).

[0090] Когда рекомбинантный экспрессионный вектор представляет собой геном вирусного вектора, геном вирусного вектора, как правило, сконструирован в форме плазмид, которые могут быть трансфицированы в пакующую клеточную линию или клеточную линию-продуцента для продукции конструкции генома вирусного вектора. Плазмида, как правило, содержит последовательности, пригодные для репликации плазмиды в бактерии. Такие плазмиды хорошо известны в данной области техники. Кроме того, векторы, которые включают прокариотический источник репликации, могут также включать ген, экспрессия которого обеспечивает детектируемый или селектируемый маркер, такой как маркер лекарственной устойчивости. Типичными продуктами устойчивости к антибактериальным средствам являются те, которые придают устойчивость к ампициллину или тетрациклину.

[0091] В некоторых конфигурациях рекомбинантные экспрессионные векторы содержат полинуклеотидные последовательности, которые кодируют факторы созревания/стимулирования дендритных клеток (DC). Типичные

стимулирующие молекулы включают GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-15, IL-21, IL-23, TNFα, B7.1, B7.2, 4-1BB, лиганд CD40 (CD40L), лекарственно-индуцируемый CD40 (iCD40) и тому подобное. Эти полинуклеотиды, как правило, находятся под контролем одного или более регуляторных элементов, которые направляют экспрессию кодирующих последовательностей в дендритных клетках. Созревание дендритных клеток способствует успешной вакцинации (см., например, Banchereau et al., Nat. Rev. Immunol. 5:296-306 (2005); Schuler et al., Curr. Opin. Immunol. 15:138-147 (2003); Figdor et al., Nat. Med. 10:475-480 (2004)). Созревание может трансформировать DC из клеток, активно участвующих в захвате антигена, в клетки, приспособленные к Т-клеточному праймингу. Например, вовлечение CD40 с помощью CD40L на CD4-Т-клетках-хелперах является важным сигналом для созревания DC, что приводит к мощной активации Т-клеток CD8+. Такие стимулирующие молекулы называют также факторами созревания или факторами, стимулирующими созревание.

[0092] Иммунные контрольные точки представляют собой существенные барьеры для активации функционального клеточного иммунитета при раке, а антагонистические антитела, специфические к ингибирующим лигандам на Т-клетках, включая CTLA4 и лиганд программируемой смерти-1 (PD-1), являются примерами целевых агентов, анализируемыми в клиниках. Важным механизмом толерантности при хронических инфекциях и раке является функциональное истощение антиген-специфических Т-клеток, которые экспрессируют высокие уровни PD-1. Поскольку продемонстрировано, что эффективность терапевтической иммунизации значительно повышалась при использовании комбинации с управлением иммунными контрольными точками, в качестве не ограничивающего примера, который может быть оценен обычным специалистам в этой области техники, предложен альтернативный подход к ингибированию активности иммунной контрольной точки, который представляет собой ингибирование экспрессии лигандов программированной смерти (PD) один и два (PD-L1/L2). Одним из способов осуществления ингибирования является способ с применением экспрессии молекул

РНК, таких как описанные в настоящем документе, которые подавляет экспрессию PD-L1/L2 в DC, трансдуцированных геномом вирусного вектора, таким как лентивирусный векторный геном, кодирующий одну или более соответствующих молекул. Созревание DC или экспрессию отдельных элементов, таких как иммунные контрольные точки, например, лиганды PD-1, можно охарактеризовать с помощью проточной цитометрии с анализом повышающей регуляции поверхностного маркера, такого как MHC II, и с помощью профилирования экспрессированных хемокинов и цитокинов, например, путем выполнения методик и способов, описанных в настоящем документе.

[0093] В другом варианте реализации изобретения для ретровирусных векторов, описанных в настоящем документе, таких как лентивирусные векторы, описанные в настоящем документе, лентивирусный вектор может содержать нуклеиновую кислоту, которая кодирует иммуноген, и тот же или отдельный лентивирусный вектор может содержать нуклеиновую кислоту, которая кодирует одноцепочечное антитело (например, scFV), которое связывает и блокирует активность ингибитора контрольной точки. В другом варианте реализации изобретения лентивирусные векторы, описанные в настоящем документе, которые нацелены на дендритные клетки, могут содержать нуклеиновую кислоту, которая кодирует иммуноген, и тот же или отдельный лентивирусный вектор может содержать нуклеиновую кислоту, которая понижающе регулирует или иным образом ингибирует экспрессию молекулы иммунной контрольной точки, экспрессируемой дендритной клеткой.

[0094] Иллюстративные молекулы иммунных контрольных точек, которые могут быть нацелены на блокирование или ингибирование, включают, но не ограничиваются ими, CTLA-4, 4-1BB (CD137), 4-1BBL (CD137L), PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4 (принадлежит к семейству молекул CD2 и экспрессируется на всех NK, $\gamma\delta$, и T-клетках памяти $CD8^+$ ($\alpha\beta$)), CD160 (также называемый BY55) и CGEN-15049. Ингибиторы иммунных контрольных точек включают антитела или их антиген-связывающие фрагменты, или другие связывающие

белки, которые связываются и блокируют или ингибируют активность одного или более из элементов: CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4, CD160 и CGEN-15049. Иллюстративные ингибиторы иммунной контрольной точки включают тремелимумаб (блокирующее антитело CTLA-4), анти-OX40, моноклональное антитело PD-L1 (анти-B7-H1; MEDI4736), ипилимумаб, MK-3475 (блокатор PD-1), ниволумамб (антитело анти-PD1), CT-011 (антитело анти-PD1), моноклональное антитело BY55, AMP224 (антитело анти-PDL1), BMS-936559 (антитело анти-PDL1), MPLDL3280A (антитело анти-PDL1), MSB0010718C (антитело анти-PDL1) и Yervoy/ипилимумаб (ингибитор контрольной точки анти-CTLA-4).

[0095] Последовательность, кодирующая детектируемое вещество, обычно белок, может быть включена для обеспечения идентификации клеток, которые экспрессируют желаемый иммуноген. Например, флуоресцентный маркерный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP), включается в рекомбинантную экспрессионную конструкцию вместе с полинуклеотидной последовательностью, представляющей интерес (то есть, кодирующей по меньшей мере один иммуноген). В других случаях белок может быть обнаружен с помощью антитела, или белок может представлять собой фермент, который действует на субстрат с получением детектируемого вещества, или может представлять собой белковый продукт, который позволяет выбрать трансфицированные или трансдуцированные клетки-мишени, например, придает резистентность к лекарственному препарату, такую как резистентность к гигромицину. Типичные гены селекции кодируют белки, которые придают резистентность к антибиотикам или другим токсинам, пригодным для использования в эукариотических клетках, например, неомицину, метотрексату, бластицидину, в числе других, известных в данной области техники, или дополняют ауксотрофные дефициты, или снабжают необходимыми питательными веществами, удержанными из питательной среды. Селективный маркер может необязательно присутствовать на отдельной плазмиде и вводятся путем котрансфекции.

[0096] Что касается векторных частиц, описанных в настоящем

документе, то могут использоваться одна или более мультицистронных экспрессионных единиц, которые включают две или более полинуклеотидных последовательности, кодирующей иммуноген, и последовательность, кодирующую молекулу оболочки, как описано в настоящем документе, или один или более факторов созревания DC, необходимых для продукции желаемой векторной частицы в пакующих клетках. Использование мультицистронных векторов уменьшает общее число необходимых молекул нуклеиновых кислот, и, таким образом, позволяет избежать возможных трудностей, связанных с координацией экспрессии из множества векторных геномов. В мультицистронном векторе различные элементы, которые будут экспрессирваться, функционально связаны с одним или более промоторами (и другими элементами контроля экспрессии, в случае необходимости). В некоторых конфигурациях мультицистронный вектор содержит последовательность, кодирующую по меньшей мере один иммуноген (т.е. один или более), представляющий интерес, последовательность, кодирующую репортерный продукт, и последовательность, кодирующую один или более компонентов векторной частицы. В некоторых вариантах реализации изобретения, в которых рекомбинантная конструкция включает полинуклеотид, кодирующий иммуноген, конструкция дополнительно кодирует фактор созревания DC. В некоторых вариантах реализации изобретения конструкция включает полинуклеотид, который кодирует онкогенный вирусный антиген и опухолеассоциированный антиген. В некоторых других вариантах реализации изобретения мультицистронный вектор содержит полинуклеотидные последовательности, которые кодируют каждый из иммуногенов, фактор созревания DC и, необязательно, вирусные компоненты, когда экспрессионный вектор представляет собой вирусный экспрессионный вектор.

[0097] Каждый компонент для экспрессии в мультицистронном экспрессионном векторе может быть разделен, например, с помощью элемента участка внутренней посадки рибосомы (IRES) или вирусного элемента 2A, с целью обеспечения возможности раздельной экспрессии различных белков из того же промотора. Элементы IRES и элементы 2A известны в данной области техники (см., например, патент США № 4937190; de Felipe et al. 2004.

Traffic 5: 616-626). В одном конкретном варианте реализации изобретения олигонуклеотиды, такие как последовательности сайта расщепления фурином (RAKR) (см., например, Fang et al. 2005 Nat. Biotech. 23: 584-590), связанные с 2A-подобными последовательностями из вируса ящура (FMDV); вируса ринита лошадей (ERAV); и вируса thosea asigna (TaV) (см., например, Szymczak et al. 2004 Nat. Biotechnol. 22: 589-594) используются для разделения генетических элементов в мультицистронном векторе. Эффективность конкретного мультицистронного вектора может легко быть проверена путем определения экспрессии каждого из генов с использованием стандартных протоколов.

[0098] В конкретном варианте реализации изобретения геном вирусного вектора включает: энхансерную/промоторную последовательность цитомегаловируса (ЦМВ); R- и U5-последовательности из HIV 5' LTR; пакующую последовательность (ψ); необязательно клапанный сигнал HIV-1; внутренний энхансер; внутренний промотор; ген, представляющий интерес; реагирующий элементвируса гепатита сурка; амбер-супрессорную последовательность тРНК; элемент U3 с делецией его энхансерной последовательности; инсулятор куриного β глобина; и R- и U5-последовательности 3' HIV LTR. В некоторых примерах векторный геном содержит интактный лентивирусный 5' LTR и самоинактивирующийся 3' LTR (см., например, Iwakuma et al. Virology 15:120, 1999).

[0099] Конструкция вектора генома может быть осуществлена с использованием любых пригодных методов генной инженерии, известных в данной области техники, включая, без ограничения, стандартные методы расщепления рестрикционной эндонуклеазой, лигирование, трансформацию, очистку плазмиды и секвенирование ДНК, например, как описано в Sambrook et al. (1989 and 2001 editions; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY); Coffin et al. (Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1997)); и "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000), содержание которых включено в настоящий документ

посредством ссылки в полном объеме.

[00100] Кроме того, могут быть использованы векторы, построенные для временной экспрессии в клетках млекопитающих. Временная экспрессия предусматривает использование экспрессионного вектора, который способен эффективно реплицироваться в клетке-хозяине, вследствие чего клетка-хозяин накапливает много копий экспрессионного вектора, и, в свою очередь, синтезирует высокие уровни полипептида, кодируемого иммуноген-специфическим полинуклеотидом в экспрессионном векторе. См. Sambrook et al., выше, pp. 16.17-16.22, 1989. Другие векторы и способы, пригодные для адаптации к экспрессии полипептидов, хорошо известны в данной области техники и могут быть легко адаптированы к конкретным условиям.

[00101] Используя принципы, приведенные в настоящем документе, и знания в данной области техники, специалист в данной области техники поймет, что эффективность конкретной экспрессионной системы может быть проверена путем трансфекции пакующих клеток вектором, содержащим полинуклеотидную последовательность, кодирующую белок-репортер, и измерения экспрессии с использованием пригодного способа, например, путем измерения флуоресценции зеленого флуоресцентного белкового конъюгата. Другие пригодные репортерные гены хорошо известны в данной области техники.

[00102] Рекомбинантный экспрессионный вектор, который содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую иммуноген, может быть использован для продукции иммуногена. Рекомбинантные экспрессионные векторы включают по меньшей мере одну регулирующий экспрессию последовательность, такую как промоторную или энхансерную, которая функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим иммуноген. Каждый из экспрессионных векторов может использоваться для трансформации, трансдукции или трансфекции соответствующей клетку-хозяина для получения рекомбинантного соответствующего иммуногена. Подходящие клетки-хозяева для продукции иммуногена включают прокариоты, дрожжи и высшие эукариотические клетки (например, CHO и COS). Каждый иммуноген может быть отдельно выделен из соответствующей клетки-

хозяина или культуры клеток-хозяев с использованием любого из множества способов выделения (например, фильтрации, диафильтрации, хроматографии (включая аффинную хроматографию, жидкостную высокого давления) и препаративного электрофореза), известных и обычно используемых в области техники продукции белка. В некоторых вариантах реализации изобретения, как описано в настоящем документе, выделенный иммуноген затем может быть скомпонован с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом для получения иммуногенной композиции.

[00103] Конкретные способы рекомбинантного получения полипептидов, как правило, хорошо известны и часто используются. Например, принципы молекулярной биологии описываются Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989; см. также Sambrook et al., 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (2001)). Секвенирование ДНК может быть осуществлено, как описано в Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463 (1977)) и в справочнике по plc-секвенированию Amersham International, включая уточнения к нему.

Векторные частицы

[00104] В другом варианте реализации изобретения предлагаются векторные частицы. Векторная частица содержит любой из рекомбинантных экспрессионных векторов, описанных в настоящем документе, которые включают полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один иммуноген. В некоторых других вариантах реализации изобретения векторная частица содержит рекомбинантную экспрессионную систему, которая содержит один рекомбинантный экспрессионный вектор (также называемый первым рекомбинантным экспрессионным вектором), содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один иммуноген, который индуцирует специфический иммунный ответ. Также в настоящем документе предлагаются способы доставки полинуклеотида, кодирующего по меньшей мере один иммуноген (как описано в настоящем документе), в клетку-мишень. В конкретных вариантах реализации изобретения клетка-мишень представляет собой иммунную клетку, которая является антиген-представляющей

клеткой; в более конкретных вариантах реализации изобретения и как описано в настоящем документе, клетка-мишень представляет собой дендритную клетку. Такие способы включают приведение в контакт (т.е. обеспечение взаимодействия) клетки-мишени с транспортным средством, которое доставляет полинуклеотид. В конкретных вариантах реализации изобретения, описанных подробно в данном документе, способы доставки полинуклеотида включают приведение в контакт клетки путем введения субъекту векторной частицы, которая содержит рекомбинантный экспрессионный вектор, включающий полинуклеотидную последовательность, которая кодирует иммуноген. Векторные частицы, рекомбинантные экспрессионные векторы, полинуклеотиды и иммуногены обсуждаются более подробно в настоящем документе.

[00105] Дендритные клетки (DC) являются основными антиген-представляющими клетками для инициации и контроля иммунных ответов. DC могут развиваться по двум путям: один путь не зависит от моноцитов, а второй путь является производным от моноцитов (Mo-DC). Моноциты крови в культуре с GM-CSF и IL-4 приобретают дендритную морфологию и выраженные способности для инициирования адаптивного иммунитета (см., например, Bender, et al., J. Immunol. Methods 196(2), 121 (1996); Sallusto et al., J. Exp. Med. 179(4), 1109 (1994), в том числе в организме человека in vivo (см., например, Dhodapkar, et al., J. Clin. Invest 104(2), 173 (1999); Schuler-Thurner, et al., J. Immunol. 165(6), 3492 (2000)). Более эффективных иммуноген-специфических Т-клеточных ответов можно достичь с помощью вакцины с векторными частицами, в частности системы лентивирусной векторной частицы, которая эффективно доставляет иммуногены непосредственно в Mo-DC in vivo, без необходимости клеточной манипуляции ex vivo. Человеческие Mo-DC экспрессируют высокие уровни двух рецепторов лектина С-типа, рецептора маннозы (MMR) и не-интегрина DC-специфической межклеточной захватывающей молекулы адгезии-3 (DC-SIGN). Как описано более подробно в настоящем документе, экспрессия иммуногенов может быть нацелена на Mo-DC с использованием рекомбинантного лентивирусного вектора, сконструированного для нацеливания на DC-SIGN.

[00106] DC-SIGN-целевая оболочка, SVGmu, состоящий из сконструированного гликопротеина вируса Синдбис (SIN), который селективно связывает DC-SIGN, был модифицирован согласно описанию (см. приведенное в данном документе описание и заявку на патент США № 12/842609 и международную заявку на патент № PCT/US10/042870). Лентивирусный вектор индуцировал высоко функциональный CD8 Т-клеточный иммунный ответ после однократной иммунизации у мышей (см., например, Dai, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A (2009); Yang, et al., Nat. Biotechnol. 26(3), 326 (2008)). Этот прототип был значительно усовершенствован благодаря двум основным модификациям. Этот лентивирусный вектор, описанный в настоящем документе, содержит гликопротеиновую оболочку (обозначаемую SINvar1), основанную на нативном SIN, арбовирусе, известном своим инфицированием дермальных DC с помощью рецептора DC-SIGN (см., например, Gardner, et al., J. Virol. 74(24), 11849 (2000); Klimstra, et al., J. Virol. 77 (22), 12022 (2003)), который модифицирован с целью предотвращения связывания с убиквитарными гепарансульфатными рецепторами (см., например, Klimstra et al., J. Virol. 72(9), 7357 (1998)). Оболочка SINvar1 обеспечивает как повышение продуктивности, так и функциональности in vivo по сравнению с родительской оболочкой SVGmu. Вектор также является некомпетентным для чрезмерной интеграции из-за комбинации мутантной интегразы (polD64V), что делает его нефункциональным (см., например, Apolonia, et al., Mol. Ther. 15 (11), 1947 (2007)), а векторная цепь удалена из U3-области LTR (вплоть до att) и 3'-LTR-полипуринового тракта (PPT). Таким образом, в дополнение к отключенной интегразе, композиция цепи вектора предотвращает транскрипцию полноразмерного векторного генома (самоинактивирующая мутации), что приводит к обратно транскрибированным LTR-единичным эписомным дцДНК-кругам в инфицированной DC, которые не являются шаблоном для хромосомной интеграции (см., например, Bayer, et al., Mol. Ther. 16(12), 1968 (2008); Breckpot et al., J. Virol. (2010); Ma et al., Mol. Ther. 10(1):139 (2004)). Около 75% родительского генома HIV было удалено из DC-NILV, включая все регуляторные и вспомогательные

белки за исключением Rev. После однократного введения DC-NILV индуцирует высокопрочный опухолевый антиген-специфический CD8 Т-клеточный ответ. Эффективность лентивекторной вакцинации зависит по меньшей мере частично от вовлечения рецепторов, распознающих паттерны TLR3 и TLR7 (см., например, et al., J. Virol. (2009); Breckpot et al., выше). DC-NILV может индуцировать иммунный ответ эквивалентный величине его интегрирующего аналога и может использоваться в гомологичном режиме "прайм-буст".

[00107] В некоторых вариантах реализации изобретения векторная частица представляет собой частицу вирусного вектора, а в других определенных вариантах реализации изобретения векторная частица представляет собой частицу, полученную из бактерии, такой как, например, Listeria monocytogenes, Salmonella spp., Mycobacterium bovis, Escherichia coli, Shigella spp. и Yersinia spp. (см., например, Paterson, Semin. Immunol (2010) 22:183; Loessner, Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4:157; Daudel, Expert Rev. Vaccines (2007) 6:97). Типичная векторная частица включает лентивирусную векторную частицу, которая содержит лентивирусный векторный геном; поксвирусную векторную частицу, которая содержит поксвирусный векторный геном; векторную частицу вируса осповакцины, которая содержит геном вируса осповакцины; аденовирусную векторную частицу, которая содержит аденовирусный векторный геном; векторную частицу вируса, ассоциированного с аденовирусом, которая содержит векторный геном вируса, ассоциированного с аденовирусом; герпесвирусную векторную частицу, которая содержит герпесвирусный векторный геном (например, вирус простого герпеса I или II); или альфа-вирусную векторную частицу, которая содержит альфа-вирусный векторный геном.

[00108] В более конкретном варианте реализации изобретения векторная частица представляет собой лентивирусную векторную частицу, которая содержит лентивирусный векторный геном (который подробно описан выше). Также в настоящем документе предлагаются способы и композиции для нацеливания на клетки и нацеливания на дендритные клетки (DC), в частности, с использованием частицы лентивирусного вектора (который также может называться вирионом,

лентивирусной частицей) для доставки последовательности, которая кодирует по меньшей мере один иммуноген для DC. Частица лентивирусного вектора содержит вариант гликопротеиновой оболочки, полученный из вируса Синдбис E2 и рекомбинантную экспрессионную конструкцию, содержащую геном, который включает последовательности, представляющие интерес, и необязательно другие компоненты. Вариант гликопротеина характеризуется пониженным связыванием с гепарансульфатом по сравнению с гликопротеином из HR, эталонным штаммом вируса Синдбис. Гликопротеин оболочки облегчает инфицирование дендритных клеток с помощью лентивирусных векторных частиц. В данном контексте термин "облегчение" инфицирования является аналогичным термину "облегчение" трансдукции и относится к роли гликопротеина оболочки, заключающейся в индивидуальной или совместной с другими молекулами активности, направленной на промоторное или энхансерное рецептор-опосредованное внедрение частицы псевдотипированного ретровируса или лентивируса в клетку-мишень.

[00109] В целом, лентивирусные векторные частицы получают с помощью клеточной линии, которая содержит один или более плазмидных векторов и/или включает элементы, которые вместе кодируют компоненты, необходимые для создания функциональных векторных частиц. Эти лентивирусные векторные частицы, как правило, репликативно некомпетентны, то есть они способны только на один цикл инфекции. Чаще всего для разделения различных генетических компонентов, которые генерируют лентивирусные векторные частицы, используется множество плазмидных векторов или отдельные экспрессионные кассеты, стабильно интегрированные в хромосомы продуцентов клеток; тем не менее, может быть использован единственный плазмидный вектор, имеющий все лентивирусные компоненты. В одном из иллюстративных примеров, пакующая клеточная линия является трансфицированной одной или более плазмидами, содержащих геном вирусного вектора, включая LTR, цис-действующие пакующие последовательности, а также последовательности, представляющие интерес (то есть по меньшей мере нуклеотидную последовательность, кодирующую один иммуноген), по меньшей мере одну плазмиду, кодирующую

ферментативные и структурные компоненты вируса (например, gag и pol), и по меньшей мере одну плазмиду, кодирующую гликопротеин оболочки арбовируса. Вирусные частицы почкуются через клеточную мембрану и содержат ядро, которое включает обычно два РНК-генома, содержащих последовательности, представляющие интерес, и гликопротеин оболочки арбовируса, который нацелен на дендритные клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения арбовирусный гликопротеин представляет собой гликопротеин вируса Синдбис E2, при этом гликопротеин сконструирован так, чтобы характеризоваться пониженным связыванием с гепарансульфатом по сравнению с E2 из эталонного штамма HR. Это, как правило, включает по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью HR гликопротеина E2. Кроме того, гликопротеин E2 может быть сконструирован с целью повышения направленной специфичности к дендритным клеткам.

[00110] Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что связывание вирусной частицы с поверхностью клетки индуцирует эндоцитоз, в результате чего вирус проникает в эндосомы, вызывая слияние мембран и позволяя ядру вируса войти в цитозоль. В некоторых вариантах реализации изобретения, которые используют интегрированные лентивирусные векторные частицы, после обратной транскрипции и миграции продукта в ядро, геном вируса встраивается в геном клетки-мишени, присоединяя последовательности, представляющие интерес, к геному клетки-мишени. Чтобы уменьшить вероятность инсерционного мутагенеза и содействовать временной экспрессии определенного иммуногена (иммуногенов), в других вариантах реализации изобретения все же используются неинтегрирующие лентивирусные векторные частицы (то есть, те, которые не интегрируются в геном клетки-мишени), между тем экспресируя последовательности, представляющие интерес, из эписомы. В любом случае, инфицированная DC затем экспрессирует последовательности, представляющие интерес (например, иммуногена и необязательно стимулирующей молекулы). Иммуноген может быть подвергнут обработке дендритными клетками и представлен Т- и В-клетками, генерируя антиген-специфический иммунный ответ. Специфический путь, описанный выше, не требуется до тех пор,

пока дендритная клетка способна стимулировать антиген-специфический иммунный ответ.

[00111] Вирусные частицы могут быть введены субъекту с целью обеспечения профилактического или терапевтического эффекта. После инфицирования дендритных клеток и экспрессии иммуногенного вещества, иммунный ответ генерируется на вещества.

Оболочка вирусного вектора

[00112] Вирусы, распространяемые членистоногими (арбовирусы), представляют собой вирусы, которые передаются к хозяину, такому как люди, лошади, или птицы с помощью инфицированного вектора членистоногих, таких как комар. Арбовирусы в свою очередь делятся на подсемейства вирусов, включая альфавирусы и флавивирусы, которые имеют одноцепочечный РНК-геном положительной полярности и оболочку, содержащую гликопротеин. Например, вирус лихорадки денге, вирус желтой лихорадки и вирус лихорадки Западного Нила принадлежат к семейству флавивирусов, а вирус Синдбис, вирус вирус леса Семлики и вирус венесуэльского конского энцефалита являются членами семейства альфавирусов (см., например, Wang et al., J. Virol. 66, 4992 (1992)). Оболочка вируса Синдбис включает два трансмембранных гликопротеина (см., например, Mukhopadhyay et al. Nature Rev. Microbiol. 3, 13 (2005)): E1, который, как полагают, является ответственным за слияние, а E2, который, как полагают, является ответственным за связывание клеток. Гликопротеины оболочки вируса Синдбис известны у псевдотипов других ретровирусов, в том числе онкоретровирусов и лентивирусов.

[00113] Как уже обсуждалось в настоящем описании, x гликопротеин оболочки арбовирусов может быть использован для векторного генома на основе псевдотипированного лентивируса. "Псевдотипированный" лентивирус представляет собой лентивирусную частицу, имеющую один или более гликопротеинов оболочки, которые кодируются вирусом, отличающимся от лентивирусного генома. Гликопротеин оболочки может быть модифицирован, мутирован или инженерно сконструирован, как это описано в данном документе. Таким образом, частицы лентивирусного вектора, описанные в

настоящем документе, включают псевдотипированный лентивирус с гликопротеином оболочки арбовируса, например, гликопротеином оболочки альфавируса или флавивируса, например, гликопротеином E2, который может быть модифицирован, мутирован или инженерно сконструирован. Лентивирусы также могут быть псевдотипированы с другими оболочками, включая VSV-G, вирус гриппа, ареновирус, рабдовирус, ортомиксовирус, HIV1, HIV2 и SIV.

[00114] Оболочка вируса Синдбис и других альфавирусов включена в липидный бислой мембраны вирусной частицы, и, как правило, содержит множество копий двух гликопротеинов: E1 и E2. Каждый гликопротеин имеет трансмембранные области; E2 имеет цитоплазматический домен из около 33 остатков, тогда как цитоплазматический хвост E1 очень короткий (около 2 остатков). Как E1, так и E2 имеют пальмитиновые кислоты, присоединенные в пределах или вблизи трансмембранных областей. E2 сначала синтезируется как белок-предшественник, который расщепляется фурином или другой Ca2+ -зависимой сериновой протеиназой на E2 и малый гликопротеин, называемый E3. Между последовательностями, кодирующими E2 и E1, расположена последовательность, кодирующая белок, называемый 6K. E3 и 6K являются сигнальными последовательностями, которые служат для транслокации гликопротеинов E2 и E1 в мембрану, соответственно. В геноме вируса Синдбис, кодирующая область для Синдбис белков оболочки включает последовательность, кодирующую E3, E2, 6K и E1. В данном контексте "оболочка" вируса семейства арбовирусов включает по меньшей мере E2, и может также включать E1, 6K и E3. Примерная последовательность гликопротеинов оболочки вируса Синдбис, штамм HR, представлена в виде SEQ ID NO: 17. Последовательности гликопротеинов оболочки для других арбовирусов могут быть найдены в общедоступных базах данных, таких как GenBank. Например, последовательности, кодирующие гликопротеины вируса лихорадки денге, можно найти в Доступе GQ252677.1 (в частности, в GenBank), а также в базе данных изменений вирусов NCBI (доступ к GenBank и базе данных изменений вирусов включены в качестве ссылки для последовательностей гликопротеина оболочки), а типовую последовательность,

кодирующую гликопротеинов оболочки вируса венесуэльского конского энцефалита - в Доступе NP_040824.1 (включен в качестве ссылки для последовательностей гликопротеинов оболочки).

[00115] Несмотря на то, что клеточный(е) рецептор(ы) на дендритных клетках для альфавирусов и вируса Синдбис, в частности, на сегодняшний день окончательно не определен(ы), один рецептор, как представляется, - это DC-SIGN (см., например, Klimstra et al., J. Virol. 77:12022, 2003). Термины «прикрепление», «связывание», «нацеливание» и тому подобные используются как взаимозаменяемые и не предназначены для того, чтобы обозначать механизм взаимодействия гликопротеина оболочки вируса Синдбис и клеточным компонентом. DC-SIGN (специфический для дендритных клеток ICAM-3 (неинтегрин внутриклеточной захватывающей молекулы адгезии-3); также известный как CD209) является лектин-подобным рецептором С-типа, способным к быстрому связыванию и эндоцитозу материалов (см., например, Geijtenbeek et al. Annu. Rev. Immunol. 22: 33-54, 2004). E2, как представляется, нацелевает вирус в дендритные клетки посредством DC-SIGN. Как показано в настоящем документе, клетки, экспрессирующие DC-SIGN, трансдуцированы псевдотипированными частицами вирусного вектора вируса Синдбис E2 лучше (по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз или меньшей мере в 10 раз лучше) по сравнению с изогенными клетками, которые не экспрессируют DC-SIGN. Механизм содействия гликопротеина E2 развитию вирусной инфекции, как представляется, связан с DC-SIGN, возможно, путем прямого связывания с DC-SIGN или изменение конформации или посредством какого-либо другого механизма. Независимо от существующего механизма, нацеливание E2 является предпочтительным для клеток, экспрессирующих DC-SIGN, а именно дендритных клеток.

[00116] Вирус Синдбис также, по-видимому, связывается с клетками через гепарансульфат (см., например, Klimstra et al., J. Virol. 72: 7357, 1998; Burmes et al., J. Virol. 72: 7349, 1998). Поскольку гепарансульфат и другие клеточные поверхностные

гликозаминогликаны обнаруживаются на поверхности большинства типов клеток, то желательно уменьшить взаимодействие между гепарансульфатом и гликопротеинами оболочки вируса Синдбис. Это может быть достигнуто путем уменьшения связывания оболочки вируса Синдбис с гепарансульфатом или увеличения связывания, например, увеличение авидности, оболочки вируса Синдбис с дендритными клетками или посредством обоих механизмов. Как результат, ослабляется неспецифическое связывания с другими молекулами, которые могут быть экспрессированы другими типами клеток, и возникающее даже если оболочка является специфичной для DC-SIGN, а улучшенная специфичность может служить для предотвоащения возникновения нежелательных побочных эффектов, таких как побочные эффекты, которые могут уменьшить желаемый иммунный ответ, или побочные эффекты, связанные с внецелевой трансдукцией других типов клеток. В альтернативном варианте или в дополнение к преимуществам относительно специфической трансдукции клеток, экспрессирующих DC-SIGN, вирусные частицы, псевдотипированы гликопротеином E2 оболочки вируса Синдбис, может иметь и другие преимущества по сравнению с вирусными частицами, псевдотипированными гликопротеинами, такими как VSV-G. Примерами таких преимуществ являются снижение опосредованного комплементом лизиса и/или уменьшение целевой направленности нейрональных клеток, при этом оба механизма, как полагают, ассоциированы с введением вирусных частиц, псевдотипированных VSV-G.

[00117] В различных примерах лентивирусные векторные частицы специфически связываются с клетками, экспрессирующими DC-SIGN, и ослабляют или блокируют связывание с гепарансульфатом. То есть гликопротеин E2 оболочки вируса Синдбис может быть модифицирован с целью предпочтительного направления вируса в дендритные клетки, которые экспрессируют DC-SIGN, по сравнению с другими типами клеток. Такие гликопротеины оболочки преимущественно связывают дендритные клетки, особенно дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN, по сравнению с другими типам клеток, которые убиквитарно экспрессируют гепаринсульфат, такие как миелоидные или

лимфоидные клетки. Как описано ниже, это предпочтительное связывание в идеальном варианте приводит к преимущественному инфицированию дендритных клеток, особенно тех, которые экспрессируют DC-SIGN. На основании информации, полученной от структурных исследований и молекулярного моделирования в рамках других исследований, последовательности вариантов белков оболочки, особенно гликопротеинов E2 и E1, разработаны и генерируются таким образом, что гликопротеины сохраняют свои функции белков оболочки, но обладают желаемой способностью к специфическому связыванию, авидности, или уровню связывания. Последовательности кандидатных вариантов могут быть созданы для каждого гликопротеина и оцениваться с помощью способов, описанных ниже, или других способов, известных в данной области техники, для идентификации гликопротеинов оболочки с наиболее желательными характеристиками.

[00118] Некоторые последовательности вариантов Синдбис E2 имеют по меньшей мере одно изменение аминокислоты в остатке 160 по сравнению с SEQ ID NO: 1. Остаток 160 удален или заменен на аминокислоту, не являющейся глутаминовой кислотой. Изменение чаще всего представляет собой замену по меньшей мере одной аминокислоты, но в альтернативном варианте может быть добавление или удаление одной или более аминокислот. Предпочтительно, чтобы любые дополнительные аминокислоты были малочисленными и не содержали антигенный эпитоп (например, тег-последовательность гемагглютинина), который может поставить под угрозу безопасность. При наличии двух или более изменений, они оба могут иметь аналогичный тип (например, замена) или различные типы (например, замена и удаление). Множественные изменения могут быть разбросаны или расположены смежно в белковой последовательности.

[00119] В качестве примера, последовательности вариантов включают по меньшей мере одно изменение аминокислоты в области от около остатка 50 до около остатка 180 последовательности SEQ ID NO: 1. В пределах этой области находятся аминокислоты, которые вовлечены в связку с гепарансульфатом. За счет снижения суммарного положительного заряда E2, электростатическое

взаимодействие с гепарансульфатом может быть уменьшено, что приводит к ослаблению связывания с гепарансульфатом. Кандидатные положительно заряженные аминокислоты в этой области включают лизины в остатках 63, 70, 76, 84, 97, 104, 129, 131, 133, 139, 148, 149, 159 и аргинин в остатках 65, 92, 128, 137, 157, 170, 172 (см., например, Bear et al., Virology 347: 183-190, 2006) (см. SEQ ID NO:1). По меньшей мере некоторые из этих аминокислот непосредственно вовлечены в связывание с E2-связку с гепарансульфатом. Суммарный положительный заряд может быть уменьшен путем удаления лизина или аргинина или замены лизина или аргинина на нейтральную или отрицательно заряженную аминокислоту. Например, один или более этих лизинов и аргининов могут быть заменены на глутаминовую или аспарагиновую кислоту. В некоторых вариантах реализации изобретения существует по меньшей мере одна замена лизина 70, 76 или 159. Типичные аминокислотные последовательности гликопротеина E2, приведены в SEQ ID NO:3 (например, остатки от 66 до 488), 4 (например, остатки от 66 до 488) и 5 (например, остатки от 66 до 486). В тех случаях, когда E2 экспрессируется в виде полипротеина с E3, лизин, расположенный рядом с природным сайтом расщепления E3/E2, сохраняется, то есть последовательность распознавания и сайт расщепления не изменяются. В альтернативном варианте последовательность сайта расщепления нативной эндопептидазой заменяется последовательностью распознавания для другой эндопептидазы.

[00120] Некоторые варианты E2 также модифицированы таким образом, что оказывают положительное влияние на связывание дендритных клеток. Изменение глутаминовой кислоты, обнаруженное в остатке 160 в эталонной последовательности HR, может улучшить связывание с дендритными клетками (см., например, Gardner et al., J. Virol. 74, 11849, 2000). Изменения, такие как делеция остатка 160 или замена остатка 160, опредляются в некоторых вариантах. В отдельных вариантах незаряженную аминокислоту заменяют на Glu, в других вариантах некислую аминокислоту заменяют на Glu. Как правило, Glu160 заменяется одной из малых или алифатических аминокислот, в том числе глицином, аланином,

валином, лейцином или изолейцином.

[00121] Другие варианты включают два или более изменений аминокислот. Как правило, в этих вариантах одно изменение представляет собой Glu160, а остающееся изменение (изменения) представляет собой изменения одного или более лизинов и аргининов в этой области остовного остатка от около 50 до около 180 последовательности SEQ ID NO: 1. Некоторые из вариантов включают изменение Glu160 на некислый остаток или делецию, и одно или более изменений лизина 70, лизина 76, или лизина 159 с неосновной аминокислотой. Некоторые конкретные варианты включают Glu160 на Gly, Lys 70 на Glu и Lys 159 на Glu; Glu 160 на Gly, Lys 70, 76 и 159 на Glu; делецию Glu 160 и Lys 70 и 159 на Glu; и делецию Glu 160 и Lys 70, 76 и 159 на Glu. Подразумевается, что нумерация позиций, используемых в настоящем документе, осуществляется со ссылкой на последовательность SEQ ID NO: 1, таким образом, что, например, если аминокислота удалена или вставлена, нумерация адаптируется соответствующим образом. Например, если остаток 1 отсутствует, то позиция 160 относится к позиции 159.

[00122] В некоторых вариантах реализации изобретения белок E2 сначала экспрессируется в виде полипротеина в слиянии по меньшей мере с E3 или в слиянии с лидерной последовательностью. Независимо от того, является ли E3 лидерной последовательностью или другой последовательностью, E2 в вирусной оболочке должен быть свободным от E3 или другой лидерной последовательности. Другими словами, предпочтительно, чтобы E2 не был слитым белком E3/E2 (например, слитым белком E3/E2, называемым SVGmu). В некоторых вариантах реализации изобретения E2 экспрессируется как часть полипротеина E3-E2-6K-E1. В природе вирус Синдбис экспрессирует E2 как часть полипротеина, а области перехода для E3/E2, E2/6K и 6K/E1 имеют последовательности, распознаваемые и расщепляемые эндопептидазами. Как правило, соединение E3/E2 расщепляется фурином или фуриноподобной сериновой эндопептидазой между остатками 65 и 66. Фурин обладает специфичностью по отношению к спаренным остаткам аргинина, которые разделены двумя аминокислотами. Для поддержания расщепления E3/E2 фурином

остатки 62-66 (RSKRS; SEQ ID NO: 26) должны поддерживать два остатка аргинина с двумя аминокислотными разделениями и остатком серина. В альтернативном варианте вместо последовательности фуринового расщепления E3/E2 или любой другой последовательности расщепления можно использовать отличающуюся последовательность расщепления. Сайты распознавания и расщепления могут быть включены для эндопептидаз, включая, без ограничения, аспарагиновую эндопептидазу (например, катепсин D, химозин, ВИЧ-протеазу), цистеиновую эндопептидазу (бромелаины, папаин, калпаин), металлоэндопептидазы (например, коллагеназу, термолизин), сериновые эндопептидазы (например, химотрипсин, фактор IXa, фактор X, тромбин, трипсин), стрептокиназы. Последовательности сайтов распознавания и расщепления для этих ферментов хорошо известны.

[00123] Аминокислоты в E2, кроме упомянутых выше, также могут быть изменены. Как правило, последовательность вариантов E2 будет иметь по меньшей мере на 80% идентичности аминокислотной последовательности с эталонной последовательностью E2, или она может иметь по меньшей мере 82%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности. Таким образом, любой из вариантов гликопротеинов E2, описанный выше, с любой мутацией, описанной выше (включая, но не ограничиваясь ими, мутации в положении 160, или в одном или более лизинов и аргининов в области остовного остатка от около 50 до около 180, например, 70, 76 и/или 159), может иметь по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности с любой из эталонных последовательностей E2, например, последовательность зрелого гликопротеида E2 SEQ ID NO: 1, 3 (например, остатки от 66 до 488), 4 (например, остатки от 66 до 488) или 5 (например, остатки от 66 до 486). Вариант гликопротеина должен обладать биологической функцией, такой как способность облегчать инфицирование дендритных клеток вирусной частицей, имеющей оболочку, содержащую E2. Эксперименты выявили области гликопротеинов оболочки, которые, как представляется, играют

важную роль в различных аспектах вирусной сборки, прикреплении к поверхности клетки и инфицировании. При создании вариантов следующая информация может быть использована в качестве руководства. Цитоплазматический хвост E2 - остатки от около 408 до 415 - важен для сборки вируса (см., например, West et al. J. Virol. 80: 4458-4468, 2006; что включено в настоящий документ в полном объеме). Другие области участвуют в формировании вторичной структуры (остатки от около 33 до 53), а также участвуют в транспорте и стабильности белка (остатки от около 86 до 119) (см., например, Navaratmarajah et al., J. Virol. 363:124-147, 2007; что включено в настоящий документ в полном объеме). Вариант может сохранять гидрофобный характер области, которая охватывает мембрану, остатки от около 370 до 380. Вариант может сохранять один или оба N-связанные сайта гликозилирования остатков NIT (остатки 196-198) и NFT (остатки 318-320) и может сохранять один или более сайтов, которые являются пальмитоилированными (C396, C416 и C417) (см., например, Strauss et al., Microbiol. Rev. 58, 491-562, 1994; pp. 499-509, что в полном объеме включено в настоящий документ посредством ссылки). С другой стороны, многие области E2 могут быть изменены без пагубного результата. Например, инсерции транспозонов в многих различных местах в E2 тем не менее приводили к жизнеспособному вирусу (см., например, Navaratmarajah, выше).

[00124] В определенных вариантах реализации изобретения тег-пептид может быть введен в белки E3, 6K или E1. Для некоторых целей, тег может быть введен в E2, но тег нежелательно использовать в качестве продукта для введения людям. Тег-пептид, который представляет собой короткую последовательность (например, 5-30 аминокислот), могут быть использованы для облегчения обнаружения экспрессии оболочки, и ее присутствия в вирусных частицах. Для целей обнаружения, тег-последовательность, как правило, может быть обнаружена с помощью антител или химических веществ. Другое использование тега заключается в облегчении очистки вирусных частиц. Субстрат, содержащий партнер по связыванию для тега, может быть

использован для абсорбции вируса. Элюирование вируса может быть достигнуто путем обработки фрагментом, который смещает тег от партнера по связыванию, или когда тег-последовательность находится в связи с расщепляемой последовательностью, обработкой соответствующей эндопептидазой будет удобно достичь высвобождения вируса. (См., например, каталог Qiagen®, Factor Xa Protease System). Удаление тег-пептида, как правило, желательно в целях безопасности при использовании вирусных частиц для субъектов-животных. Если тег не удалить, на него может возникнуть иммунный ответ.

[00125] Пригодные теги включают, без ограничения, FLAG (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 35) (патент США № 4703004, который включен в настоящее описание в полном объеме), для которых антитела являются коммерчески доступными, хитин-связывающий белок, белок, связывающий мальтозу, глутатион-S-трансферазу, поли(His) (патент США № 4569794, который включен в настоящее описание в полном объеме), тиоредоксин, HA (гемагглютинин)-тег наряду с некоторыми другими. Поли(His) может быть адсорбирован на аффинных средах, содержащих связанные ионы металлов, такие как никель или кобальт, и элюирован с помощью среды с низким pH.

[00126] Векторные частицы могут быть оценены с целью определения специфичности гликопротеина оболочки, включенного в вирус, который нацелен на дендритные клетки. Например, смешанная популяция клеток костного мозга может быть получена от субъекта и культивирована in vitro. В альтернативном варианте могут быть получены и использоваться изогенные клеточные линии, которые экспрессируют или не экспрессируют DC-SIGN. Рекомбинантный вирус может быть введен в смешанную популяцию клеток костного мозга или изогенные клеточные линии, а экспрессия гена-репортера, включенного в вирус, может быть проанализирована в культуре клеток. Некоторые варианты реализации изобретения могут использовать анализ предельного разведения, в котором смешанная популяция клеток разбивается на отдельные части, которые затем по отдельности, инкубируются с уменьшением количества вируса (например, в 2 раза, в 5 раз, в 10 раз меньше вируса в каждой

части). В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере около 50% или по меньшей мере около 60%, 70%, 80% или 90%, или по меньшей мере около 95% инфицированных клеток в смешанной клеточной популяции являются дендритными клетками, которые экспрессируют DC-SIGN. В некоторых вариантах реализации изобретения отношение инфицированных дендритных клеток к инфицированным недендритным клеткам (или клеткам, неэкспрессирующим DC-SIGN), по меньшей меньшей мере около 2:1, по меньшей меньшей мере около 3:1, по меньшей мере около 4:1, по меньшей мере около 5:1, по меньшей мере около 6:1, по меньшей мере около 7:1, по меньшей мере около 8:1, по меньшей мере около 9:1, по меньшей мере около 10:1, по меньшей мере около 20:1, по меньшей мере около 30:1, по меньшей мере около 40:1, по меньшей мере около 50:1, по меньшей меньшей мере около 100:1, по меньшей меньшей мере около 200:1, по меньшей меньшей мере около 500:1, по меньшей меньшей мере около 1000:1, по меньшей мере около 5000:1, по меньшей мере около 10000:1 или более. Для предельного разведения более высокая селективность обычно наблюдается при более высоких разведениях (т.е. меньших количествах) вводимого вируса.

[00127] Активность псевдотипированных вирусных частиц можно определить с помощью любой из множества методик. Например, предпочтительный способ для оценки эффективности инфекционности (IU, инфекционные единицы) заключается во введении вирусных частиц в клетки и измерение экспрессии продукта, закодированного в векторном геноме. Для использования пригоден любой продукт, который может быть количественно оценен. Одним таким подходящим типом продукта является флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP). Другие продукты, которые могут использоваться, включают белки, экспрессируемые на поверхности клеток (например, обнаружение с помощью связывания антитела), ферменты и тому подобное. Если продукт представляет собой антиген, а клетки представляют собой дендритные клетки, инфекционность/активность может быть оценена путем определения иммунного ответа. Кроме того, можно определить побочные эффекты у млекопитающих. Способность к специфическому нацеливанию на

дендритные клетки также может быть оценена непосредственно, например, в клеточной культуре, как описано ниже.

[00128] Векторные частицы, которые включают вирусные частицы, описанные в данном документе, могут также быть получены и оценены на их селективность и/или способность облегчать проникновение через мембрану клетки-мишени. Вирусные частицы, имеющие оболочку с немодифицированными гликопротеинами, могут быть использованы в качестве контроля для сравнения. Вкратце, клетки, экспрессирующие рецептор для гликопротеина оболочки, являются инфицированными вирусом с использованием стандартного количественного анализа инфицирования. По истечении заданного времени, например через 48 часов после инфицирования, клетки могут быть собраны и процент клеток, инфицированных вирусом, можно определить, например, с помощью проточной цитометрии. Селективность может расссчитана путем вычисления процента клеток, инфицированных вирусом. Аналогичным образом, влияние варианта гликопротеина оболочки на титр вируса может быть количественно определено путем деления процента клеток, инфицированных вирусом, содержащим вариант оболочки на процент клеток, инфицированных вирусом, содержащим соответствующий гликопротеин оболочки дикого типа (немодифицированный). Наиболее подходящий вариант будет иметь наилучшее сочетание селективности и инфекционного титра. После выбора варианта могут выполняться анализы концентрации вируса с целью подтверждения того, что эти вирусы могут концентрироваться без потери активности. Вирусные супернатанты собирают и концентрируют с помощью ультрацентрифугирования. Титры вирусов могут быть определены путем ограниченного разведения вирусного маточного раствора и инфицирования клеток, экспрессирующих рецептор для гликопротеина оболочки, измеряя экспрессию продукта, экспрессируемого вирусами, как описано выше.

[00129] Введение лентивирусной векторной частицы в клетку-мишень представляет собой другой тип оценки активности. Слитый белок BlaM-Vpr (бета-лактамаза Vpr) использовали для оценки проникновения вируса HIV-1; слияние BlaM и гликопротеина (такого как E1 или слитого белка E2/E1) оболочки вируса Синдбис может

быть использовано для оценки эффективности белка оболочки в содействии слиянию и проникновению в клетку-мишень. Вирусные частицы могут быть получены, например, путем временной трансфекции различных пакующих клеток одним или более векторов, содержащих вирусные элементы, BlaM-Vpr и вариант оболочки, представляющей интерес (и молекулу аффинности, если необходимо). Полученные вирусы могут быть использованы для инфицирования клеток, экспрессирующих молекулу, являющуюся нацеливающей молекулой (или молекулой аффинности), которая специфически связывается в случае отсутствия или при наличии свободного ингибитора связывания (такого как антитело). Клетки затем могут быть промыты CO2-независимой средой и обработаны красителем CCF2 (Aurora Bioscience). После инкубации при комнатной температуре для завершения реакции расщепления, клетки могут быть зафиксированы в параформальдегиде и проанализированы с помощью проточной цитометрии и микроскопии. Наличие синих клеток указывает на проникновение вирусов в цитоплазму; меньшее количество синих клеток можно ожидать при добавлении блокирующих антител (см., например, Cavrois et al., Nat. Biotechnol. 20:1151-54, 2002).

[00130] Для того, чтобы проанализировать, как влияют на проникновение низкие значения pH, а также определить гликопротеины оболочки с желаемой pH-зависимостью, NH4Cl или другое соединение, которое приводит к изменению pH, может быть добавлено на этапе инфицирования (NH4Cl будет нейтрализовать кислотные элементы эндосом). В случае с NH4Cl, исчезновение синих клеток будет означать, что проникновение вирусов является зависимым от низкого значения pH. Кроме того, чтобы подтвердить, что активность является pH-зависимой, лизосомотропные агенты, такие как хлорид аммония, хлорохин, конканамицин, бафиломицин A1, момензин, нигерицини т.д., могут быть добавлены в инкубационный буфер. Эти агенты повышают pH в пределах эндосомных элементов (см., например, Drose et al., J. Exp. Biol. 200, 1-8, 1997). Ингибирующее действие этих агентов будет прояснять роль pH для вирусного слияния и проникновения. Различные кинетические характеристики проникновения вирусов,

отображающие различные фузогенные молекулы, могут сравниваться, а наиболее пригодные - выбираться для конкретного применения.

[00131] Анализы проникновения, основанные на ПЦР, могут использоваться для мониторинга обратной транскрипции и измерения кинетики синтеза вирусной ДНК, как показателя кинетики проникновения вируса. Например, вирусные частицы, содержащие определенную белковую молекулу оболочки, инкубируют с клетками-мишенями, такими как клетки 293T, DC или любыми другими клетками, которые сконструированы с целью экспрессирования, или которые естественным образом экспрессируют соответствующего партнера по связыванию (рецептора) для белковой молекулы оболочки. Либо сразу, либо после определенного периода времени (необходимого для осуществления инфицирования) несвязанные вирусы удаляются, а аликвоты клеток анализируют на наличие вирусных нуклеиновых кислот. ДНК экстрагируют из этих аликвот и подвергают анализу амплификации, как правило, в полуколичественному анализу, примированному LTR-специфическими праймерами. Появление LTR-специфических продуктов ДНК указывает на успешное проникновение вируса.

[00132] После вирусного инфицирования частицей вирусного вектора, иммуноген экспрессируется дендритными клетками-мишенями. При контакте ex vivo дендритные клетки-мишени затем возвращаются обратно пациенту, например, путем инъекции, где они взаимодействуют с иммунными клетками, которые способны генерировать иммунный ответ, направленный против желаемого антигена. В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения рекомбинантный вирус вводят в организм пациента, где он трансдуцирует дендритные клетки-мишени in situ. Дендритные клетки затем экспрессируют специфический антиген, ассоциируемый с заболеванием или нарушением, которое подлежит лечению, и есть возможность получить эффективный иммунный ответ против заболевания или нарушения у пациента.

[00133] Геном вирусного вектора может содержать полинуклеотидную последовательность, кодирующую более чем один иммуноген, и в условиях трансдукции дендритной клетки-мишени, формирует иммунные ответы на каждый иммуноген, доставленный в

клетку. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногены связаны с одним заболеванием или нарушением. В других вариантах реализации изобретения иммуногены связаны с множеством заболеваний или нарушений.

[00134] В некоторых векторных частицах факторы созревания DC, которые активизируют и/или стимулируют созревание DC, доставляются в сочетании с иммуноген-кодирующей последовательностью, представляющей интерес. В некоторых альтернативных вариантах реализации изобретения DC активируются доставкой факторов созревании DC до, одновременно или после доставки векторных частиц. Факторы созревания DC могут применяться отдельно от введения векторных частиц.

[00135] Как описано в настоящем описании, один или более факторов иммунной модуляции или созревания DC могут кодироваться одной или более последовательностями, которые содержатся в векторной частице и экспрессируются после того, как частица входит или инфицирует дендритную клетку. Последовательности, кодирующие факторы иммунной модуляции, также могут быть представлены в отдельном векторе, который котрансфицируется векторной частицей, кодирующей один или более иммуногенов в пакующей клеточной линии.

[00136] Способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для адоптивной иммунотерапии у субъекта. Как было описано выше, иммуноген, против которого желательно получить иммунный ответ, является идентифицированным. Полинуклеотид, кодирующий желаемый иммуноген (иммуногены), получают и пакуют в векторную частицу. Дендритные клетки-мишени получают от пациента и трансдуцируют векторной частицей, содержащей полинуклеотид, который кодирует желаемый иммуноген. Дендритные клетки затем переносят обратно в организм пациента.

[00137] Векторные частицы (например, вирусные векторные частицы, описанные в данном документе) могут быть введены in vivo, причем частицы инфицируют DC и доставляют иммуноген-кодирующую нуклеотидную последовательность, представляющую интерес. Количество вирусных частиц составляет по меньшей мере 3X106 инфекционных единиц (IU) и может составлять по меньшей

мере 1X107 IU, по меньшей мере 3X107 IU, по меньшей мере 1X108 IU, по меньшей мере 3X108 IU, по меньшей мере 1X109 IU или по меньшей мере 3X109 IU. Через определенные промежутки времени DC из лимфоидных органов реципиента могут быть использованы для измерения уровня экспрессии, например, путем анализа экспрессии маркеров, таких как GFP или люцифераза, в случае коэкспрессирования полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в рекомбинантном экспрессионном векторе, и включения в векторную частицу. Методики мониторинга нуклеиновых кислот и измерения активности обратной транскриптазы (RT) также могут быть использованы для анализа биораспределения векторных частиц, если векторная частица представляет собой лентивирусную векторную частицу. Т-клетки из мононуклеарных клеток периферической крови, лимфатических узлов, селезенки или злокачественной или целевой патоген-инфицированной ткани векторной частицы (включая лентивирусную векторную частицу), пролеченного реципиента, могут быть измерены на предмет силы и устойчивости ответа на антигенную стимуляцию. Тканевые клетки, за исключением DC, такие как эпителиальные клетки и лимфоидные клетки, могут быть проанализированы на специфичность при доставке генов in vivo.

Адъюванты и адъювантные композиции

[00138] Описанные в настоящем документе способы включают введение субъекту по меньшей мере одной композиции, содержащей адъювант, который предназначен для "подтягивания" примированных иммунных клеток в локальное место введения, в частности, в место опухоли. В другом варианте реализации изобретения композиции, содержащие адъювант, дополнительно содержат иммуноген, в некоторых вариантах реализации изобретения иммуноген "прайма". Такие композиции, содержащие адъювант, могут не содержать иммуноген и, таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения, композиции, содержащие адъювант, по существу, лишены иммуногена. В некоторых вариантах реализации изобретения адъювантн усиливает (или улучшает, увеличивает) иммунный ответ на иммуноген (т.е. повышает уровень специфического иммунного ответа на иммуноген статистически, биологически или клинически

значимым образом по сравнению с уровнем специфического иммунного ответа в отсутствие введения адъюванта). Способы и методики определения уровня иммунного ответа обсуждаются более подробно в данном документе и обычно применяются в данной области техники.

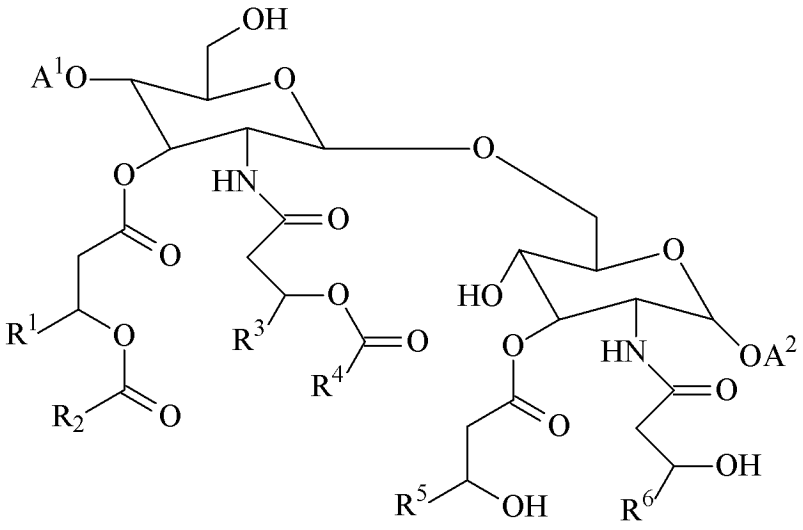
[00139] Примеры адъювантов, которые могут быть использованы в способах, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, следующие. Адъюванты, которые могут быть использованы в способах, описанных в настоящем документе, включают адъюванты, которые могут быть пригодны для усиления CTL-ответа на иммуноген (или на иммуноген-содержащие клетки или частицы) и/или усиления памяти CD4 Т-клеточного ответа. В некоторых вариантах реализации изобретения адъюванты для использования в способах по настоящему изобретению индуцируют цитокиновый ответ, с тем, чтобы вовлекать Т-клетки, в частности антиген-специфические Т-клетки, в локальное место введения. В другом варианте реализации изобретения адъюванты для использования в способах по настоящему изобретению усиливают ответ на иммуноген, не вызывая конформационных изменений в иммуногене, которые могут отрицательно повлиять на качественную характеристику ответа. Пригодные адъюванты включают соли алюминия, такие как алюмокалиевые квасцы (сульфат калий-алюминия) или другие адъюванты, содержащие алюминий; адъюванты, связанные с нетоксичным липидом А, такие как, в качестве не ограничивающего примера, не токсичный монофосфориллипид А (см., например, Tomai et al., J. Biol. Response Mod. 6:99-107 (1987)), GLA, описанные в настоящем документе; 3 De-O-ацилированный монофосфориллипид А (MPL) (см., например, заявку на патент Великобритании № GB 2220211); адъюванты, такие как QS 21 и QuilA, которые включают тритерпеновый гликозид или сапонин, выделенный из коры дерева Quillaja saponaria Molina, произрастающего в Южной Америке (см., например, Kensil et al., in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell and Newman, Plenum Press, NY, 1995); патент США № 5057540). Другие пригодные адъюванты включают эмульсии масло в воде (такие как сквален или арахисовое масло), необязательно - в комбинации с иммунными стимуляторами, такими как

монофосфориллипид A (см., например, Stoute et al., N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)). Еще одним пригодным адъювантом является CpG (Bioworld Today, Nov. 15, 1998). Другие пригодные адъюванты включают агонисты Toll-подобных рецепторов и миметики липида A, такие как аминоалкил глюкозаминид 4-фосфаты (AGP) (см., например, RC527, описанный в Baldridge et al., Expert Opin. Biol. Ther., 4(7):1129-1138 (2004), и RC-544, описанный в Persing et al., Trends in Microbiology, 10(10) (suppl.):S32-S37 (2002)).

[00140] Как описано в настоящем документе, пригодный адъювант представляет собой соль алюминия, такую как гидроксид алюминия, фосфат алюминия, сульфат алюминия. Такие адъюванты могут быть использованы в сочетании или без других специфических иммуностимулирующих агентов, таких как MPL или 3-DMP, QS21, полимерных или мономерных аминокислот, таких как полиглутаминовая кислота или полилизин. Еще один класс пригодных адъювантов предсталяет собой эмульсионные композиции масло в воде (также называемые в данном описании стабильной эмульсией масло в воде). Необязательно такие адъюванты могут использоваться с другими специфическими иммуностимулирующими агентами, такими как мурамилпептиды (например, N-ацетилмурамил-L-треонил-D-изоглутамин (thr-MDP), N-ацетил-нормурамил-L-аланил-D-изоглутамин (nor-MDP), N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутаминил-L аланин-2-(1'-2'дипалмитоил-sn- -глицеро-3-гидроксифосфорилокси)-этиламин (MTP-PE), N-ацетилглюкзаминил-N-ацетилмурамил-L-Al-D-изоглу-L-Ala-дипалмитокси пропиламид (DTP-DPP) терамид™), или другими компонентами клеточной стенки бактерий. Эмульсии масло в воде включают (1) MF59 (WO 90/14837), содержащий 5% Сквален, 0,5% Твин 80 и 0,5% Спэн 85 (необязательно содержащий различные количества MTP-PE), изготовленный в виде субмикронных частиц с использованием микрофлюидизатора, такого как микрофлюидизатор модели 110Y (Microfluidics, Newton Mass.); (2) SAF, содержащий 10% Сквален, 0,4% Твин 80, 5% плюроник-блокирующий полимер L121 и thr-MDP, либо микрофлуидизированный в субмикронную эмульсию, либо

перемешанный на вортексе с целью получения эмульсии с частицами большого размера, и (3) адъювантную систему Ribi (RAS), (Ribi Immunochem, Гамильтон, Монтана), содержащую 2% Сквален, 0,2% Твин 80 и один или более компонентов бактериальной клеточной стенки из группы, состоящей из монофосфориллипида А (MPL), трегалоз димиколата (TDM) и скелета клеточной стенки (CWS), предпочтительно MPL+CWS (Detox™). Кроме того, как описано выше, пригодные адъюванты включают сапониновые адъюванты, такие как Stimulon™ (QS21, Aquila, Вустер, штат Массачусетс) или частицы, сформированные из них, такие как ISCOM (иммуностимулирующие комплексы) и ISCOMATRIX. Другие адъюванты включают полный адъювант Фрейнда (CFA) (который подходит для использования для нечеловекообразных животных, но не для использования человеку) и неполный адъювант Фрейнда (IFA). Другие адъюванты включают цитокины, такие как интерлейкины (IL-1, IL-2 и IL-12), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), и фактор некроза опухоли (TNF).

[00141] Еще одни адъювант, который может быть использован в композициях, описанных в настоящем документе, определен химической формулой (I) и упоминается как глюкопиранозил липид А (GLA):



(I)

(I)

где фрагменты A1 и A2 независимо друг от друга выбраны из

группы, включающей водород, фосфат и фосфатные соли. Натрий и калий являются типичными противоионами для фосфатных солей. Фрагменты R1, R2, R3, R4, R5 и R6 независимо друг от друга выбраны из группы, включающей гидрокарбил, имеющий от 3 до 23 атомов углерода, представленных C3-C23. Для большей ясности будет пояснено, что, когда фрагмент "независимо выбран из" указанной группы, имеющей множество элементов, следует понимать, что элемент, выбранный для первого фрагмента, каким-либо образом не влияет или не ограничивает выбор элемента, выбранного для второго фрагмента. Атомы углерода, к которым присоединены R1, R3, R5 и R6, являются асимметричными, и, таким образом, могут существовать либо в R-, либо в S-стереохимии. В одном варианте реализации изобретения все эти атомы углерода находятся в R-стереохимии, в то время как в другом варианте все эти атомы углерода находятся в S-стереохимии.

[00142] "Гидрокарбил" обозначает химический фрагмент, образованный полностью из водорода и углерода, в котором расположение атомов углерода может быть в неразветвленной или разветвленной цепи, нециклическим или циклическим, а связи между соседними атомами углерода могут быть полностью одинарными связями, то есть, для получения насыщенного гидрокарбила, или могут быть двойными или тройными связями, имеющиеся между любыми двумя соседними атомами углерода, то есть, для получения ненасыщенные гидрокарбила, при этом число атомов углерода в углеводородной группе составляет от 3 до 24 атомов углерода. Гидрокарбил может быть алкилом, когда представленные неразветвленной цепью алкилы включают метил, этил, н-пропил, н-бутил, н-пентил, н-гексил и тому подобное, включая ундецил, додецил, тридецил, тетрадецил, пентадецил, гексадецил, гептадецил, октадецил и др.; тогда как разветвленные алкилы включают изопропил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, изопентил и тому подобное. Типичные насыщенные циклические гидрокарбилы включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и тому подобное; тогда как ненасыщенные циклические гидрокарбилы включают циклопентенил и циклогексенил и тому подобное. Ненасыщенные гидрокарбилы содержат по меньшей мере одну двойную

или тройную связь между соседними атомами углерода (называемые "алкенил" или "алкинил", соответственно, если гидрокарбил не является циклическим, и циклоалкенил, и циклоалкинил, соответственно, если гидрокарбил по меньшей мере частично циклический). Типичные алкенилы с неразветвленной и разветвленной цепью включают этиленил, пропиленил, 1-бутенил, 2-бутенил, изобутенил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-метил-1-бутенил, 2-метил-2-бутенил, 2,3-диметил -2-бутенил и тому подобное; тогда как типичные алкинилы с неразветвленной и разветвленной цепью включают ацетиленил, пропинил, 1-бутинил, 2-бутинил, 1-пентинил, 2-пентинил, 3-метил-1-бутинил и тому подобное.

[00143] Адъювант по формуле (I) может быть получен синтетическими способами, известными в данной области техники, например, с помощью синтетической методологии, описанной в международной публикации PCT №. WO 2009/035528, которая включена в настоящее описание посредством ссылки, а также в публикациях, указанных в WO 2009/035528, при этом каждая из этих публикаций также включена в настоящее описание посредством ссылки. Некоторые из адъювантов также могут быть получены в промышленных масштабах. Предпочтительным адъювантом является продукт № 699800, как определено в каталоге Avanti Polar Lipids, Alabaster AL (см. E1 в комбинации с E10, ниже).

[00144] В различных вариантах реализации изобретения адъювант имеет химическую структуру согласно формуле (I), но фрагменты A1, A2, R1, R2, R3, R4, R5 и R6 выбраны из подмножеств вариантов, ранее предусмотренных для этих фрагментов, причем эти подмножества обозначаются ниже как E1, E2 и т.д.

[00145] E1: A1 представляет собой фосфат или фосфатную соль, а A2 представляет собой водород.

[00146] E2: R1, R3, R5 и R6 представляют собой алкил C3-C21; а R2 и R4 представляют собой гидрокарбил C5-C23.

[00147] E3: R1, R3, R5 и R6 представляют собой алкил C5-C17; а R2 и R4 представляют собой гидрокарбил C7-C19.

[00148] E4: R1, R3, R5 и R6 представляют собой алкил C7-C15; а R2 и R4 представляют собой гидрокарбил C9-C17.

[00149] E5: R1, R3, R5 и R6 представляют собой алкил C9-

C13; а R2 и R4 представляют собой гидрокарбил C11-C15.

[00150] E6: R1, R3, R5 и R6 представляют собой алкил C9-C15; а R2 и R4 представляют собой гидрокарбил C11-C17.

[00151] E7: R1, R3, R5 и R6 представляют собой алкил C7-C13; а R2 и R4 представляют собой гидрокарбил C9-C15.

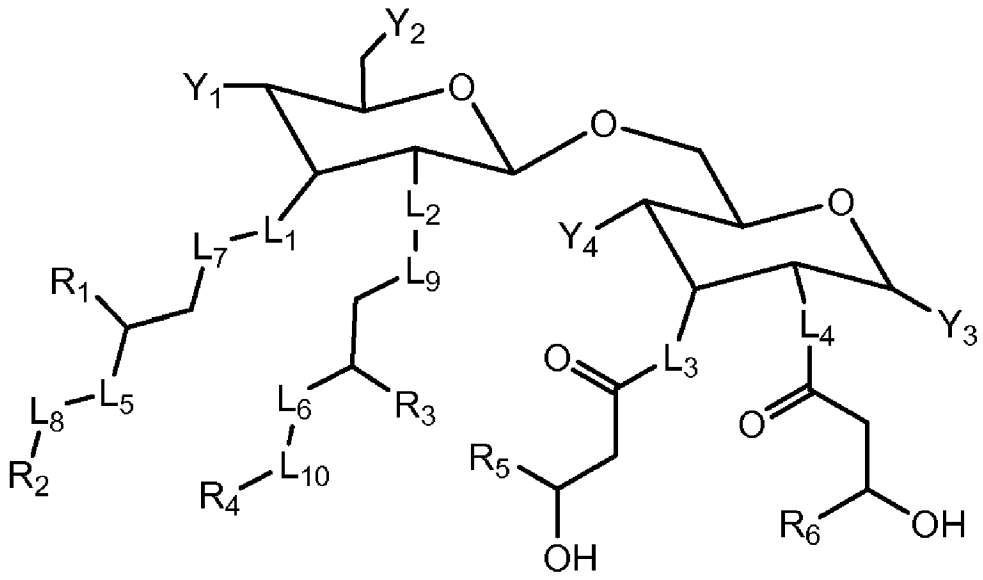
[00152] E8: R1, R3, R5 и R6 представляют собой алкил C11-C20; а R2 и R4 представляют собой гидрокарбил C12-C20.

[00153] E9: R1, R3, R5 и R6 представляют собой алкил C11; а R2 и R4 представляют собой гидрокарбил C13.

[00154] E10: R1, R3, R5 и R6 представляют собой ундецил, а R2 и R4 представляют собой тридецил.

[00155] В некоторых вариантах реализации изобретения E1 может быть комбинирован с каждым E2 через E10. Гидрокарбильные группы E2 через E9 могут быть алкильными группами, предпочтительно неразветвленными алкильными группами. В некоторых вариантах реализации изобретения E1 комбинирован с каждым E2 через E10, а все E2 через E9 представляют собой алкильные группы. В некоторых вариантах реализации изобретения E1 комбинирован с каждым E2 через E10, а все E2 через E9 представляют собой неразветвленные алкильные группы. Адъювант согласно формулы (I) может быть приготовлены в виде фармацевтической композиции, необязательно с коадъювантом каждый, как описано ниже. В этой связи сделана ссылка на публикацию патента США № 2008/0131466, в котором предлагаются составы, такие как водный состав (AF) и стабильные эмульсионные составы (SE) для адъюванта GLA, причем эти составы могут быть использованы для любого из адъювантов согласно формуле (I).

[00156] В другом варианте реализации изобретения адъювант представляет собой адъювант по типу синтетического липида A, как описано в Международной публикации PCT № WO 2010/141861, со структурой, выбранной из следующей химической формулы (II):



или его фармацевтически приемлемая соль, где: L1, L2, L3, L4, L5 и L6 являются одинаковыми или отличающимися и независимо выбранными из -O-, -NH-, и - (CH2) -; L7, L8, L9 и L10 являются одинаковыми или отличающимися, и при любом проявлении могут быть либо отсутствующими, либо -C(=O)-; Y1 представляет собой кислотную функциональную группу; Y2 и Y3 являются одинаковыми или отличающимися, и каждый независимо выбран из -OH, -SH и кислотной функциональной группы; Y4 представляет собой -OH или -SH; R1, R3, R5 и R6 являются одинаковыми или отличающимися, и каждый независимо выбран из группы, включающей алкил C8-C13; и R2 и R4 являются одинаковыми или отличающимися, и каждый независимо выбран из группы, включающей алкил C6-C11.

[00157] Необязательно, как это описано более подробно ниже и в настоящем документе, два или более различных адъювантов могут быть использованы одновременно, например, в качестве неограничивающего примера, соль алюминия с MPL, соль алюминия с QS21, MPL с QS21, и соль алюминия, QS21 и MPL вместе. Кроме того, может быть использован неполный адъювант Фрейнда (см., например, Chang et al., Advanced Drug Delivery Reviews 32, 173-186 (1998)), необязательно в комбинации с любой из соли алюминия, QS21 и MPL, и всех их комбинациях.

[00158] В некоторых вариантах реализации изобретения адъювант согласно формуле (I) может быть представлен в виде фармацевтической композиции (или адъювантной композиции),

необязательно - с коадъювантом, как было описано выше, каждый, как указано ниже, или с любым другим адъювантом, описанным в настоящем документе или доступным в данной области техники. В этой связи сделана ссылка на публикацию патента США № 2008/0131466, в котором предлагаются составы, такие как водный состав (AF) и стабильные эмульсионные составы (SE) для адъюванта GLA, причем эти составы могут быть использованы по отношению к любому из адъювантов согласно формуле (I).

[00159] Предлагаемый в настоящем документе адъювант согласно формулы I могут быть использован в комбинации со вторым адъювантом, называемым в данном описании коадъювантом. В трех типичных вариантах реализации изобретения коадъювант может представлять собой систему доставки, или может быть иммунопотенциатором, или может представлять собой композицию, которая функционирует и как система доставки, и как иммунопотенциатор (см., например, O'Hagan et al., Pharm. Res. 21(9):1519-30 (2004)). Коадъювант может представлять собой иммунопотенциатор, который функционирует через представителя биомолекул семейства Toll-подобных рецепторов. Например, для своего основного способа действия коадъювант может быть выбран либо как агонист TLR4, либо как агонист TLR8, либо как агонист TLR9. В альтернативном или дополнительном варианте коадъювант может быть выбран для своих транспортных свойств; например, коадъювант может представлять собой эмульсию, липосому, микрочастицу или алюминиевые квасцы.

[00160] В одном варианте реализации изобретения коадъювант представляет собой алюминиевые квасцы, причем этот термин относится к соли алюминия, такой как фосфат алюминия (AlPO4) и гидроксид алюминия (Al(OH)3). Когда алюминиевые квасцы используется в качестве коадъюванта, алюминиевые квасцы могут присутствовать в дозе вакцины в количестве от около 100 до 1000 мкг, или от 200 до 800 мкг, или от 300 до 700 мкг или от 400 до 600 мкг. Адъювант по формуле (1), как правило, присутствует в количестве, меньшем, чем количество алюминиевых квасцов, а также в различных конкретных вариантах реализации изобретения адъювант

по формуле (1), в расчете на массу, присутствует в количестве 0,1-1%, или 1-5%, или 1-10%, или 1-100% по отношению к массе алюминиевых квасцов.

[00161] В одном конкретном варианте реализации изобретения адъювант представляет собой эмульсию, имеющую свойства адъюванта. Такие эмульсии включают эмульсии масло-в-воде. Неполный адъювант Фрейнда (IFA) является одним из таких адъювантов. Другой пригодной эмульсией масло в воде является адъювант MF-59™, который содержит сквален, полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат (также известный как поверхностно-активное вещество Твин ™ 80) и сорбитантриолеат. Сквален представляет собой природное органическое соединение, первоначально полученное из жира печени акулы, хотя также доступное из растительных источников (в основном из растительных масел), включая семена амаранта, рисовые отруби, зародыши пшеницы и маслины. Другими пригодными адъювантами являются адъюванты Montanide™ (Seppic Inc., Фэрфилд, Нью-Джерси), в том числе Montanide™ ISA 50V, который является адъювантом на основе минерального масла; Montanide™ ISA 206; и Montanide™ IMS 1312. Несмотря на то, что в коадъюванте может присутствовать минеральное масло, в одном варианте реализации изобретения масляным компонентом (компонентами) вакцинных композиций по настоящему изобретению являются все метаболизируемые масла.

[00162] Примеры иммунопотенциаторов, которые могут быть использованы в практике способов, описанных в настоящем документе, в качестве коадъювантов включают: MPL™; MDP и их производные; олигонуклеотиды; двухцепочечная РНК; альтернативные патоген-ассоциированных молекулярные паттерны (PAMP); сапонины; низкомолекулярные иммунные потенциаторы (SMIP); цитокины; и хемокины.

[00163] В одном варианте реализации изобретения коадъювант представляет собой адъювант MPL™, который является коммерчески доступным от компании GlaxoSmithKline (первоначально разработанный компанией Ribi Immunochem Research, Inc. Гамильтон, Монтана). См., например, Ulrich and Myers, Chapter 21

from Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds. Plenum Press, New York (1995). Относящимися к адъюванту MPL™, а также пригодными в качестве коадъювантов для применения в композициях и способах, описанных в настоящем документе, являются адъювант AS02™ и адъювант AS04™. Адъювант AS02™ представляет собой эмульсию типа масло в воде, которая содержит как адъювант MPL™, так и адъювант QS-21™ (сапониновый адъювант, описанный в настоящем документе в другом месте). Адъювант AS04™ содержит адъювант MPL™ и алюминиевые квасцы. Адъювант MPL™ получают из липополисахарида (LPS) Salmonella minnesota R595 путем обработки LPS слабой кислотой и щелочного гидролиза с последующей очисткой модифицированного LPS.

[00164] В другом варианте реализации изобретения коадъювант представляет собой сапонин, такой как полученный из коры древесных пород Quillaja saponaria или модифицированный сапонин (см., например, патенты США №№ 5057540; 5273965; 5352449; 5443829; и 5560398). Продукт QS-21™ - адъювант, поставляемый компанией Antigenics, Inc. Лексингтон, Массачусетс, является типичным сапонин-содержащим коадъювантом, который может быть использован с адъювантом согласно формулы (1). Альтернативным коадъювантом, относящимся к сапонинам, является представитель семейства адъювантов ISCOM™, первоначально разработанных компанией Iscotec (Швеция) и, как правило, образованных из сапонинов, полученных из Quillaja saponaria или синтетических аналогов, холестерина и фосфолипидов, все из которых формируются в сотоподобную структуру.

[00165] В еще одном варианте реализации изобретения коадъювант представляет собой цитокин, который функционирует в качестве коадъюванта (см., например, Lin et al., Clin. Infect. Dis. 21(6):1439-49 (1995); Taylor, Infect. Immun. 63(9):3241-44 (1995); и Egilmez, Chap. 14 в Vaccine Adjuvants and Delivery Systems, John Wiley & Sons, Inc. (2007)). В различных вариантах реализации изобретения цитокин может быть, например, гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF) (см., например, Change et al., Hematology 9(3):207-15

(2004); Dranoff, Immunol. Rev. 188:147-54 (2002); и патент США 5679356); или интерфероном, таким как интерферона типа I (например, интерферон-α (IFN-α) или интерферон-β (IFN-β)), или интерфероном типа II (например, интерферон-γ (IFN-γ) (см., например, Boehm et al., Ann. Rev. Immunol. 15:749-95 (1997); и Theofilopoulos et al., Ann. Rev. Immunol. 23:307-36 (2005)); интерлейкином, в частности, включая интерлейкин-1α (IL-1α), интерлейкин-1β (IL-1β), интерлейкин-2 (IL-2) (см., например, Nelson, J. Immunol. 172(7):3983-88 (2004); интерлейкином-4 (IL-4), интерлейкином-7 (IL-7), интерлейкином-12 (IL-12) (см., например, Portielje et al., Cancer Immunol. Immunother. 52(3):133-44 (2003); и Trinchieri, Nat. Rev. Immunol. 3(2):133-46 (2003)); интерлейкином-15 (Il-15), интерлейкином-18 (IL-18); лигандом фетальной печеночной тирозинкиназы 3 (Flt3L), или фактором некроза опухолей α (TNFα). Адъювант по формуле (I) может быть совместно приготовлены с цитокином до комбинации с вакцинным антигеном, или антиген, адъювант по формуле (I) и цитокиновый коадъювант могут быть приготовлены отдельно и затем объединены.

[00166] В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаемые и описанные в настоящем документе адъюванты по формуле I или II могут быть использованы в комбинации с другим терапевтическим агентом. В одном варианте реализации изобретения адъювантные композиции по настоящему изобретению вводят в конкретных вариантах реализации изобретения в локальный участок, например, в место опухоли, в комбинации с одним или более ингибиторами иммунных контрольных точек. Иммунные контрольные точки относятся к различным ингибирующих путям иммунной системы, которые ответственны за поддержание аутотолерантности и модуляции длительности и амплитуды иммунных реакций. Опухоли используют определенные пути иммунных контрольных точек в качестве основного механизма иммунного сопротивления, особенно в отношении Т-клеток, которые являются специфическими для опухолевых антигенов. (см., например, Pardoll, 2012 Nature 12:252; Chen and Mellman 2013 Immunity 39:1). В настоящем

изобретении предлагаются ингибиторы иммунных контрольных точек, которые могут введиться в комбинации с адъювантной композицией, в частности, без антигена. Такие комбинированные виды терапии действуют согласовано для усиления иммунного ответа против рака. Некоторые вирусы также разработали механизмы кооптации путей иммунных контрольных точек. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения такая комбинированная терапия может быть использована для усиления противовирусного иммунного ответа.

[00167] Ингибиторы иммунных контрольных точек включают любой агент, который блокирует или ингибирует статистически, клинически и биологически значимым образом ингибирующие пути иммунной системы. Такие ингибиторы могут включать низкомолекулярные ингибиторы или могут включать антитела или их антиген-связывающие фрагменты, которые связываются и блокировать или ингибировать рецепторы иммунных контрольных точек, или антитела, которые связываются и блокируют или ингибируют лиганды рецепторов иммунных контрольных точек. Иллюстративные молекулы иммунных контрольных точек, которые могут быть нацелены на блокирование или ингибирование, включают, но не ограничиваются ими, CTLA-4, 4-1BB (CD137), 4-1BBL (CD137L), PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4 (принадлежит к семейству молекул CD2 и экспрессируется на всех NK, $\gamma\delta$ и T-клетках памяти $CD8^+$ ($\alpha\beta$)), CD160 (также называемый BY55) и CGEN-15049. Ингибиторы иммунных контрольных точек включают антитела или их антиген-связывающие фрагменты, или другие связывающие белки, которые связываются и блокируют или ингибируют активность одного или более из элементов: CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4, CD160 и CGEN-15049. Иллюстративные ингибиторы иммунной контрольной точки включают тремелимумаб (блокирующее антитело CTLA-4), анти-OX40, моноклональное антитело PD-L1 (анти-B7-H1; MEDI4736), MK-3475 (блокатор PD-1), ниволумаб (антитело анти-PD1), CT-011 (антитело анти-PD1), моноклональное антитело BY55, AMP224 (антитело анти-PDL1), BMS-936559 (антитело анти-PDL1), MPLDL3280A (антитело

анти-PDL1), MSB0010718C (антитело анти-PDL1) и Yervoy/ипилимумаб (ингибитор контрольной точки анти-CTLA-4).

[00168] В одном дополнительном варианте реализации изобретения адъювантные композиции по настоящему изобретению вводят в комбинации с цитокином. Под термином "цитокин" понимают общий термин для белков, высвобождаемых одной популяцией клеток, которые действуют на другую клетку как межклеточные медиаторы. Примеры таких цитокинов включают лимфокины, монокины и традиционные полипептидные гормоны. В число цитокинов входят гормоны роста, такие как человеческий гормон роста, N-метионильный человеческий гормон роста и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (FSH), тиреотропный гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); печеночный фактор роста; фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор некроза опухоли-альфа и -бета; муллериан-ингибирующее вещество; мышиный гонадотропин-ассоциированный пептид; ингибин; активин; сосудистый эндотелиальный фактор роста; интегрин; тромбопоэтин (TPO); факторы роста нервов, такие как NGF-бета; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF-альфа и TGF-бета; инсулиноподобный фактор роста-I и -II; эритропоэтин (EPO); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон-альфа, бета и -гамма; колониестимулирующие факторы (CSF), такие как макрофагальный CSF (M-CSF); гранулоцитарно-макрофагальный CSF (GM-CSF); и гранулоцитарный CSF (G-CSF); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1 альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, фактор некроза опухоли, такой как TNF-альфа или TNF-бета; и другие полипептидные факторы, включая LIF и набор-лиганд (KL). В данном контексте термин "цитокин" включает белки, полученные из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток, и биологически активные эквиваленты цитокинов с нативными последовательностями.

[00169] В некоторых вариантах реализации изобретения композиции, включающие адъюванты, описанные в настоящем

документе, могут быть введены в комбинации с хлорохином или гидроксихлорохином, лизосомотропным агентом, который предотвращает эндосомальное подкисление и ингибирует аутофагию, индуцированную опухолевыми клетками с целью сохранения ускоренного роста клеток и недостатка питательных веществ. В более общем смысле композиции, включающие адъюванты, описанные в настоящем документе, могут быть введены в комбинации с терапевтическими агентами, которые действуют как ингибиторы аутофагии, радиосенсибилизаторами или химиосенсибилизаторами, такими как хлорохин, мизонидазол, метронидазол и гипоксические цитотоксины, такие как тирапазамин. В связи с этим такие комбинации с хлорохином или другим радио- или химиосенсибилизаторами или ингибиторами аутофагии, могутт быть использованы в дополнительных комбинациях с другими противораковыми терапевтическими агентами или лучевой терапией.

[00170] В другом варианте реализации изобретения композиции, включающие адъюванты, описанные в настоящем документе, могут быть введены в комбинации с низкомолекулярными препаратами, которые, как известно, приводят к гибели опухолевых клеток с сопутствующей активацией иммунных ответов, называемой "иммуногенная гибель клеток", такие как циклофосфамид, доксорубицин, оксалиплатин и митоксантрон. Кроме того, комбинации с препаратами, которые известны повышением иммуногенности опухолевых клеток, такими как патупион (эпотилон B), моноклональное антитело 7A7.27, нацеленное на рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), ингибиторы гистондеацетилазы (например, вориностат, ромидепсин, панобиностат, белиностат и энтиностат), н3-полиненасыщенная жирная кислота докозагексаеновая кислота, кроме того, протеасомные ингибиторы (например, бортезомиб), шиконин (основной составляющей корня Lithospermum erythrorhizon) и онколитические вирусы, такие как TVec (talimogene laherparepvec). В других вариантах реализации изобретения композиции, включающие адъюванты, описанные в настоящем документе, могут быть введены в комбинации с эпигенетическими препаратами, такими как ингибиторы ДНК-метилтрансферазы

(например, децитабин, 5-аза-2'-дезоксицитидин), который может вводиться местно или системно.

[00171] В другом варианте реализации изобретения адъювантные композиции по настоящему изобретению могут быть введены в комбинации с одним или более антителами, которые увеличивают ADCC-поглощение опухоли дендритными клетками (DC). Таким образом, в настоящем изобретении предлагаются комбинированные композиции, содержащие GLA с любой молекулой, которая индуцирует или усиливает поглощение опухолевой клетки или ее фрагментов антиген-представляющими клетками с последующим представлением опухолевых антигенов иммунной системе. Эти молекулы включают агенты, которые индуцируют связывание рецепторов (таких как Fc или рецепторов маннозы) и транспортировку в антиген-представляющие клетки, такие как антитела, антитело-подобные молекулы, мультиспецифические поливалентные молекулы и полимеры. Такие молекулы могут быть введены либо внутриопухолево в композиции, содержащей GLA, либо введены с помощью другого пути. Например, композиция, содержащая GLA, как описано в настоящем документе, может быть введена внутриопухолево в сочетании с внутриопухолевой инъекцией ритуксимаба, цетуксимаба, трастузумаба, кэмпаса, панитумумаба, офатумумаба, брентуксимаба, пертузумаб, адо-трастузумаба эмтансина, обинутузумаба, антител анти-HER1, -HER2 или -HER3 (например, MEHD7945A; MM-111; MM-151; MM-121; AMG888), антител анти-EGFR (например, нимотузумаба, ABT-806), или других подобных антител. Любая поливалентная каркасная структура, которая может взаимодействовать с рецепторами Fc и другими рецепторами, имеющими возможность индуцировать интернализацию, может быть использована в комбинированных видах терапии, описанных в данном документе, например, пептиды и/или белки, способные связывать мишени, которые соединены с Fc-фрагментами или полимерами, способными взаимодействовать с рецепторами.

[00172] В некоторых вариантах реализации изобретения комбинация адъювантов с такими антителами может быть дополнительно быть комбинирована с антителом, которое активирует костимулирующий сигнал (например, путем блокирования

ингибирующих путей), таким как анти-CTLA-4, или, антителами, которые активируют костимулирующие пути, такими как антитела анти-CD40, анти-CD28, анти-ICOS, анти-OX40, анти-CD27 и тому подобное.

[00173] Композиции, содержащие адьюванты, могут вводиться отдельно или в комбинации с другими известными методами лечения рака, такими как лучевая терапия, ингибиторы иммунных контрольных точек, химиотерапия или другие терапевтические противораковые агенты, трансплантация, иммунотерапия, гормональная терапия, фотодинамическая терапия и т.д. Композиции могут также вводиться в комбинации с антибиотиками.

[00174] В комбинированных вариантах реализации изобретения, описанных в данном документе, терапевтический агент, используемый в комбинации с адъювантами, описанными в данном документе, может вводиться в виде отдельной композиции или может вводиться в той же композиции, что и адьюванты, описанные в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения комбинированные виды терапии вводят одновременно в то же самое место, но можно вводить в разное время (до или после адъювантной композиции), и в некоторых случаях - в другое место.

[00175] Композиция, содержащая иммуноген, или композиция, содержащая рекомбинантный экспрессионный вектор, который кодирует иммуноген, или векторная частица, содержащая вектор, пакуются и поставляются в отдельных флаконах, отличительных от тех, которые содержат адъювант. Соответствующие этикетки, указывающие на предполагаемое терапевтическое применение, обычно упаковывают с каждой композицией. Выбор адъюванта и/или вспомогательного вещества зависит от стабильности иммуногена, рекомбинантного экспрессионного вектора и/или векторной частицы; пути введения; схемы применения; и эффективности адъюванта для вида, который подлежит вакцинации. Относительно введения человеку, фармацевтически приемлемый адъювант представляет собой тот, который был одобрен или утвержден соответствующими регулирующими органами для введения человеку. Например, как описано в настоящем документе и известно в данной области техники, полный адъювант Фрейнда не пригоден для введения

человеку.

[00176] Адъюванты, подходящие для использования в способах, описанных в данном документе, являются физиологически или фармацевтически приемлемыми адъювантами для субъекта, которому вводят адъювант. Адъювантные композиции содержат по меньшей мере один адъювант (например, один или более адъювантов) и необязательно по меньшей мере один физиологически или фармацевтически пригодное (или приемлемое) вспомогательное вещество. Любое физиологически или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество или носитель (т.е. нетоксичный материал, который не влияет на активность активного ингредиента), известный обычным специалистам в данной области техники для использования в фармацевтических композициях, может быть использован в адъювантных композициях, описанных в настоящем документе. Типичные вспомогательные вещества включают разбавители и носители, которые поддерживают стабильность и целостность компонента(ов) адъюванта. Вспомогательные вещества для терапевтического применения хорошо известны и описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro, 21st Ed. Mack Pub. Co., Easton, PA (2005)), и описаны в настоящем документе более подробно.

Иммуногены и иммуногенные композиции

[00177] Иммуноген, который может быть использован в этих способах, включает любой иммуноген, для которого является желаемой индукция специфического иммунного ответа. Иммуноген способен индуцировать гуморальный ответ (т.е. В-клеточный ответ) или клеточный ответ (включая цитотоксический Т-клеточный ответ) или и то и другое. В частности, иммуноген, предполагаемый для использования в способах по настоящему изобретению, содержит один или более онкогенных вирусных антигенов. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуноген содержит один или более онкогенных вирусных антигенов и один или более опухолеассоциированных антигенов. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более онкогенных вирусных антигенов используется в качестве иммуногена для "прайм"- и "пулл"-иммунизаций. В другом варианте реализации изобретения

один или более онкогенных вирусных антигенов являются иммуногеном для "прайм"-введения, а один или более опухолеассоциированных антигенов являются иммуногеном для местного "пулл"-введения. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более онкогенных вирусных антигенов и один или более опухолеассоциированных антигенов используют в качестве иммуногена для "прайм"-введения, а один или более онкогенных вирусных антигенов и один или более опухолеассоциированных антигенов используют в качестве местно применяемого иммуногена для "пулл"-введения. В конкретных вариантах реализации изобретения адъювантная композиция (далее "пулл"- композиция) не содержит или, по существу, лишена иммуногена.

[00178] Клеточно опосредованный иммунный ответ, включает Т-клеточный хелперный ответ (например, ответ CD4 Т-клеток) или цитотоксический Т-лимфоцитарный ответ (например, ответ CD8 Т-клеток) или и тот, и другой, что может уничтожить или повредить клетку (например, опухолевую клетку, бактериальную клетку, вирусную, паразитарную или грибковую клетку) или инфекционную частицу (например, вирусную частицу), которая продуцирует или экспрессирует иммуноген. В качестве иммуногена может быть использован любой антиген из онкогенного вируса, который ассоциирован с индуцированием рака, и при этом гуморальный ответ или клеточно-опосредованный иммунный ответ, или и тот, и другой, являются значимыми для иммунизированного субъекта. Онкогенные вирусные агенты известны в данной области техники. Антиген может быть предварительно идентифицированным антигеном из онкогенного вируса, или може быть идентифицированным любым способом, известным в данной области техники. Например, антиген из онкогенный вируса, ассоциированного с видом рака, от которого страдает пациент, может быть известен, или может быть идентифицирован из онкогенного вируса или из самой опухоли с помощью любого из множества способов, известных в данной области техники. Один или более таких онкогенных вирусных антигенов могут быть пригодны для иммунотерапевтического лечения вирусиндуцированных раковых заболеваний, как описано в настоящем документе. Типичные онкогенные вирусы включают, но не

ограничиваются ими, EBV, HPV, HBV, HCV, HTLV и KSHV. Типичные вирусные антигены из онкогенных вирусов, которые могут быть использованы в данном изобретении, включают, но не ограничиваются ими, EBV: EBNA-1, LMP-1, LMP-2A; HPV: E6, E7, E5; HBV: HBx; HCV: Core, NS3, Ns5A; HTLV: Tax, HBZ; KSHV: vFLIP, LANA, vGPCR, vIRF-1. В конкретных вариантах реализации изобретения эти иммуногены могут быть доставлены в антиген-представляющим клеткам, в частности, дендритным клеткам, с использованием векторных частиц, описанных в данном документе, которые содержат рекомбинантный экспрессионный вектор.

[00179] В некоторых вариантах реализации изобретения иммуноген содержит антиген из онкогенного вируса и опухолеассоциированный антиген. Антигены, ассоциированные с раковыми заболеваниями, такими как рак мочевого пузыря или карцинома из клеток Меркеля или другими вирусиндуцированными видами рака, как описано в настоящем документе, хорошо известны в данной области техники. О таком антигене может быть предварительно известно, что он ассоциирован с раком, или антиген может быть идентифицирован любым способом, известным в данной области техники. Например, антиген, ассоциированный с видом рака, от которого страдает пациент, может быть известен, в том числе опухолеассоциированный антиген, или может быть идентифицирован из самой опухоли с помощью любого из множества способов, известных в данной области техники. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуноген представляет собой опухолеассоциированный антиген (также называемый в настоящем описании как опухолевый антиген), полученный из раковой клетки (то есть опухолевой клетки), при этом один или более таких опухолевых антигенов могут быть пригодны для иммунотерапевтического лечения вирусиндуцированного рака.

[00180] Опухолевые антигены, которые могут быть пригодными в качестве иммуногенов, как описано в настоящем документе и, следовательно, использоваться для лечения любого рака, включая рак мочевого пузыря или другие урогенитальные раковые заболевания, включают опухолевые антигены, полученные из видов рака, которые характеризуются экспрессией опухолеассоциированных

антигенов, в том числе экспрессией HER-2/neu. Опухолеассоциированные антигены, которые могут быть использованы в качестве иммуногенов, включают линиеспецифические опухолевые антигены, такие как антигены меланоцитарно-меланомной линии MART-1/Melan-A, gp100, gp75, mda-7, тирозиназу и белок, связанный с тирозиназой. Иллюстративные опухолеассоциированные антигены включают, но не ограничиваются ими, опухолевые антигены, полученные или содержащие один или более элементов из группы: NY-ESO-1, LAGE-1, CT7, CT10, MAGE 1, 3 и MAGE 4 (или другие антигены MAGE, такие как те, которые описаны в публикации международной патентной заявки No. WO99/40188); PREM; BAGE; RAGE, Lage (также известный как NY ESO 1); SAGE; и HAGE (см., например, публикация международной патентной заявки № WO 99/53061) или GAGE, p53, Ras, c-Myc, цитоплазматические серин/треониновые киназы (например, A-Raf, B-Raf и C-Raf, циклин-зависимые киназы), MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, MPHOSPH1 (M-фазный фосфопротеин-1), DEPDC1 (домен DEP, содержащий -1 белок), декорин, онкофетальные белки IMP3, полиомавирусный BK T-антиген, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSA, PSM, тирозиназа,TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, фосфоинозитидные 3-киназы (PI3K), рецепторы TRK,PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, опухолевый антиген Вильмса (WT1), AFP, β-катенин/m, каспаза-8 /m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, миозин/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, аннексин II, CDC27/m, TPI/mbcr-abl, BCR-ABL, регуляторный фактор интерферонов 4 (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RARα, опухолеассоциированный преобразователь кальциевого сигнала 1 (TACSTD1) TACSTD2, рецепторные тирозинкиназы (например, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) (в частности, EGFRvIII), рецептор фактора роста тромбоцитов (PDGFR), рецептор фактора роста сосудистого эндотелия (VEGFR), цитоплазматические тирозинкиназы (например, семейство src, семейство syk-ZAP70, интегрин-связанная киназа

(ILK), преобразователи сигналов и активаторов транскрипции STAT3, STAT5 и STAT6, факторы, индуцируемые гипоксией (например, HIF-1α и HIF-2α, ядерный фактор-каппа B (NF-κB), рецепторы Notch (например, Notch1-4), c-Met, мишени рапамицина у млекопитающих (mTOR), WNT, киназы, регулируемые внеклеточными сигналами (ERK) и их регуляторные субединицы, PMSA, PR-3, MDM2, мезотелин, раковые клетки почек - 5T4, SM22-альфа, карбоангидраза I (CAI) и IX (CAIX) (также известная как G250), STEAD, TEL/AML1, GD2, протеиназа 3, hTERT, контрольных точек транслокации саркомы, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (слитый ген TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, андрогеновый рецептор, циклин B1, полисиаловая кислота, MYCN, RhoC, GD3, фукозил GM1, мезотелиан, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboH, NY-BR-1, RGs5, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, белок спермы 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, легумаин, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2, fos-связанный антиген 1 и идиотип.

[00181] Типичные опухолевые антигены или антигены, полученные из раковых клеток мочевого пузыря, включают антигены рака яичка (CTA), NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10 и GAGE. MAGE 1, 3 и MAGE 4 (или другие антигены MAGE, такие как те, которые описаны в публикации международной патентной заявки № WO99/40188); PRAME; BAGE; RAGE, Lage (также известный как NY ESO 1); SAGE; и HAGE (см., например, публикация международной патентной заявки № WO 99/53061) или GAGE (Robbins et al., Curr. Opin. Immunol. 8:628-36 (1996); Van den Eynde et al., Int. J. Clin. Lab. Res. 27:81-86 (1997); Van den Eynde et al., Curr. Opin. Immunol. 9:648-93 (1997); Correale et al. J. Natl. Cancer Inst. 89: 293 (1997)). Кроме того, недавно идентифицированные онкобелки MPHOSPH1 (M-фазный фосфопротеин-1) и DEPDC1 (белок, содержащий домен DEP 1), которые в высокой степени экспрессируются при раке мочевого пузыря и могут индуцировать CTL-ответы у пациентов (Obara, W., et al., Jpn J Clin Oncol. 2012 Jul; 42 (7):591-600), и декорин, который причастен к инвазивности раковых клеток мочевого пузыря (El Behi, M., et al., EMBO Mol Med. 2013 Dec;5(12):1835-51).

Кроме того, онкофетальные белки IMP3 и MAGE-A (Xylinas, E., et al., J Urol. 2013 Aug 28. pii: S0022-5347(13)05275-0.) и полиомавирусный ВК Т-антиген (Alexiev, B.A., et al., Hum Pathol. 2013 May;44(5):908-17).

[00182] Иммуногены также включают опухолевые антигены, которые содержат эпитопные области или эпитопные пептиды, полученные из генов, мутированных в опухолевых клетках, или из генов, транскрибированных на различных уровнях в опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками, такие как теломеразный фермент, сурвивин, мезотелин, мутированный ras, реконструированный bcr/abl, Her2/neu, мутированный p53 или p53 дикого типа, цитохром P450 1B1, и аномально экспрессированные интронные последовательности, такие как N-ацетилглюкозаминилтрансфераза-V; клоновые реконструкции генов иммуноглобулина, генерирующие уникальные идиотипы при миеломах и В-клеточных лимфомах; опухолевые антигены, которые содержат эпитопные области или эпитопные пептиды, полученные из онковирусных процессов, такие как белки Е6 и Е7 вируса папилломы человека; белок LMP2 вируса Эпштейна-Барр; немутированные онкофетальные белки с опухолеселективной экспрессией, такие как карциноэмбриональный антиген и альфа-фетопротеин. См. также Boon et al., Ann. Rev. Immunol. 12:337-65 (1994); Renkvist et al., Cancer Immunol. Immunother. 50:3-15 (2001).

[00183] Иммуногены также включают онкогенные вирусные антигены, которые содержат или состоят по меньшей мере из одного иммуногенного фрагмента онкогенного вирусного белка.

[00184] Полипептиды, которые содержат по меньшей мере один иммуногенный фрагмент иммуногенного полипептида, могут быть использованы в качестве иммуногена для введения с адъювантами, как описано в настоящем документе, и/или закодированных с помощью рекомбинантных векторов экспрессии, описанных в настоящем документе. Иммуногенный аргумент содержит по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп, или по меньшей мере один В-клеточный эпитоп. Иммуногенный фрагмент может состоять по меньшей мере из 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более смежных аминокислот иммуногенного полипептида.

Иммуногенные фрагменты могут содержать достаточное количество смежных аминокислот, которые образуют линейный эпитоп, или могут содержать достаточное количество смежных аминокислот, которые позволяют сложить фрагмент в ту же (или достаточно сходную) трехмерную конформацию, что имеет полноразмерный полипептид, из которого этот фрагмент получен, и представлять нелинейный эпитоп или эпитопы (также упоминаемые в данной области техники как конформационные эпитопы). Трехмерная конформация полипептидного фрагмента является достаточно сходной с полноразмерным полипептидом, когда способность связывать и уровень связывания антитела, которое специфически связывается с полноразмерным полипептидом, по существу, аналогичные для фрагмента и для полноразмерного полипептида.

[00185] Анализы для оценки сопоставимости складчатости иммуногенного фрагмента в конформации с полноразмерным полипептидом, включают, например, способность белка вступать в реакцию с моно- или поликлональными антителами, которые являются специфическими для нативных или нескладчатых эпитопов, анализ поддержания других лиганд-связывающих функций, а также анализ чувствительности или устойчивости полипептидного фрагмента к расщеплению протеазами (см., например, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (2001)). Дополнительные способы идентификации эктопических областей включают способы, описанные в Hoffmeister et al., Methods 29:270-281 (2003); Maecker et al., J. Immunol. Methods 255:27-40 (2001). Анализы для идентификации эпитопов, которые описаны в настоящем документе и известны специалисту в данной области техники, включают, например, те, которые описаны в Current Protocols in Immunology, Coligan et al. (Eds), John Wiley & Sons, New York, NY (1991).

[00186] Определение иммуногенной области и/или эпитопа иммуногена, представляющего интерес, может быть легко осуществлено специалистом в данной области техники эмпирически или с помощью компьютерного анализа и компьютерного моделирования с использованием способов и методик, которые обычно применяют специалисты в данной области техники.

Эмпирические способы включают, в качестве примера, синтезирование фрагментов полипептида, содержащих смежные аминокислоты белка определенной длины, или получение фрагментов путем использования одной или более протеаз, а затем определения иммуногенности фрагментов с использованием любого из многочисленных анализов связывания или способов иммуноанализа, обычно применяемых в данной области техники. Типичные способы определения способности антитела (поликлонального, моноклонального или его антиген-связывающего фрагмента) к специфическому связыванию с фрагментом, включают, но не ограничиваются ими, ELISA, радиоиммуноанализ, иммунный блот, анализы конкурентного связывания, анализ сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) и поверхностный плазмонный резонанс.

[00187] Определение трехмерных структур полипептида или его иммуногенного фрагмента, представляющего интерес, может быть осуществлено с помощью обычных способов с целью определения того, сохраняет ли иммуногенный фрагмент пространственное расположение аминокислот, содержащихся в полноразмерном полипептиде. См., к примеру, Bradley et al., Science 309: 1868-1871 (2005); Schueler-Furman et al., Science 310:638 (2005); Dietz et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103:1244 (2006); Dodson et al., Nature 450:176 (2007); Qian et al., Nature 450:259 (2007). Также в данной области техники являются доступными программные средства, например, PSORT или PSORT II и Spscan (Wisconsin Sequence Analysis Package, Genetics Computer Group), которые пригодны для прогнозирования трансмембранных сегментов и мембранной топологии полипептидов, которые являются известными или предположительно пересекают клеточную мембрану (см., например, Nakai et al., Trends Biochem. Sci. 24:34-36 (1999)).

[00188] Отдельно или в сочетании с описанной выше методикой, и рассматриваемой типичной аминокислотной последовательностью полипептида, представляющего интерес, специалист в данной области техники может определить потенциальные эпитопы полипептида (см., например, Jameson and Wolf, Comput. Appl. Biosci. 4:181-86 (1988)). В качестве другого

примера, Hopp и Woods описывают способ гидрофильности, который основан на эмпирических демонстрациях тесной корреляции между гидрофильностью полипептидных областей и их антигенными свойствами (см., например, Hopp, Pept. Res. 6:183-90 (1993); Hofmann et al., Biomed. Biochim. Acta 46:855-66 (1987)). Для идентификации В-клеточных или Т-клеточных эпитопов также доступны компьютерные программы. Базовая программа, которая называется EPIPLOT, прогнозирует В-клеточные антигенные сайты белков из их первичных структур путем расчета и построения профилей гибкости, гидрофильности и антигенности с использованием 13 различных шкал (см., например, Menendez et al., Comput. Appl. Biosci. 6:101-105 (1990)). Смотрите также, в частности, Van Regenmortel, Methods: a companion to Methods in Enzymology, 9: 465-472 (1996); Pellequer et al., "Epitope predictions from the primary structure of proteins," In Peptide antigens: a practical approach (ed. G.B. Wisdom), pp. 7-25; Oxford University Press, Oxford (1994); Van Regenmortel, "Molecular dissection of protein antigens" In Structure of antigens (ed. M.H.V. Van Regenmortel), Vol. 1, pp. 1-27. CRC Press, Boca Raton (1992).

[00189] Т-клеточные эпитопы иммуногена также могут быть идентифицированы с помощью программы анализа пептидного мотива, основанной на алгоритмах, разработанных Rammensee, et al. (Immunogenetics 50: 213-219 (1999)); Parker, et al. (*supra*),; или с помощью таких способов, как способы, описанные Doytchinova и Flower в Immunol. Cell Biol. 80(3):270-9 (2002); Blythe et al., Bioinformatics 18:434-439 (2002); Guan et al., Applied Bioinformatics 2:63-66 (2003); Flower et al., Applied Bioinformatics 1:167-176 (2002); Mallios, Bioinformatics 17: 942-48 (2001); Schirle et al., J. Immunol. Meth. 257:1-16 (2001). Т-клеточные эпитопы могут быть также идентифицированы с использованием скрининговых методов, известных в данной области техники, например, с использованием пулов перекрывающихся пептидов с целью стимуляции Т-клеток *in vitro* и измерения пролиферации клеток (анализ на пролиферацию) и/или

цитотоксической гибели (анализы CTL).

[00190] Эктопические области опухоли или антигены онкогенных вирусов, которые могут быть использованы в качестве иммуногенов в способах, описанных в настоящем документе, также описаны в данной области техники. См. в качестве примера, Lamb et al., Rev. Infect. Dis. Mar - Apr: Suppl 2:s443-447 (1989); Lamb et al., EMBO J. 6:1245-49 (1987); Lamb et al., Lepr. Rev. Suppl 2:131-137 (1986); Mehra et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7013 -27 (1986); Horsfall et al., Immunol. Today 12:211-13 (1991); Rothbard et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 155:143-52 (1990); Singh et al., Bioinformatics 17:1236-37 (2001); DeGroot et al., Vaccine 19:4385-95 (2001); DeLalla et al., J. Immunol. 163:1725-29 (1999); Cochlovius et al., J. Immunol. 165:4731- 41 (2000); Consogno et al., Blood 101:1039-44 (2003); Roberts et al., AIDS Res. Hum. Retrovir. 12:593-610 (1996); Kwok et al., Trends Immunol. 22:583-88 (2001); Novak et al., J. Immunol. 166:6665-70 (2001).

[00191] В некоторых случаях, когда антиген-специфические линии Т-клеток или клоны являются доступными, например, проникающие в опухоль лимфоциты (TIL), вирус-специфические или бактериеспецифеские цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), эти клетки могут быть использованы для скрининга на наличие соответствующих эпитопов с использованием клеток-мишеней, полученных с помощью специфических антигенов. Такие мишени могут быть получены с использованием случайных, или выбранных, синтетических пептидных наборов, которые будут использоваться для сенсибилизации клеток-мишеней для лизиса с помощью CTL. Другим подходом к идентификации соответствующего эпитопа, когда Т-клеточные линии или клоны доступны, является использование рекомбинантной ДНК-методологии. Наборы генов и кДНК из CTL-чувствительных мишеней сначала получают и трансфицируют в нечувствительных клетках-мишенях. Это позволяет идентифицировать и клонировать ген, кодирующий белок-предшественник пептида, содержащего эпитоп CTL. Второй этап в этом процессе состоит в подготовке укороченных генов из соответствующего клонированного гена, для того, чтобы сузить область, которая кодирует по

меньшей мере один эпитоп CTL. Этот этап является необязательным, если ген не слишком велик. Третий этап состоит в подготовке синтетических пептидов, например, имеющих около 10-20 аминокислот в длину, перекрывающихся 5-10 остатками, которые используются для сенсибилизации мишени для CTL. Когда пептид, или пептиды, как показано, содержат соответствующий эпитоп, и, при необходимости, для установления пептида минимального размера, который содержит эпитоп, могут быть получены более мелкие пептиды. Эти эпитопы, как правило, но не обязательно, содержат в пределах 9-10 остатков для CTL-эпитопов и до 20 или 30 остатков для эпитопов Т-лимфоцитов хелперов (HTL).

[00192] В альтернативном варианте эпитопы могут быть определены путем прямого элюирования пептидов, которые нековалентно связаны определенными молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC), с последующим секвенированием аминокислот этих элюированных пептидов (см., например, Engelhard et al., Cancer J. 2000 May;6 Suppl 3:S272-80). Вкратце, элюированные пептиды разделяют с помощью способы очистки, такого как ВЭЖХ, и отдельные фракции тестируют на их способность повышать чувствительность мишени для лизиса CTL или индуцировать пролиферацию секреции цитокинов в HTL. Когда фракция была определена как содержащая пептид, она подлежит дополнительной очистке и анализу последовательности. Пептидная последовательность также может быть определена с использованием тандемной масс-спектрометрии. Синтетический пептид затем готовят и анализируют с CTL или HTL для подтверждения того, что последовательность и пептид были идентифицированы правильные.

[00193] Эпитопы могут также быть идентифицированы с помощью компьютерного анализа, такого как программа Tsites (см., например, Rothbard и Taylor, EMBO J. 7:93-100, 1988; Deavin et al., Mol. Immunol. 33: 145-155, 1996), который осуществляет поиск пептидных мотивов, имеющих потенциал для получения Th-ответов. Пептиды CTL с мотивами, подходящие для связывания с мышиным и человеческим MHC класса I или класса II могут быть идентифицированы в соответствии с BIMAS (Parker et al., J. Immunol. 152:163, 1994) и другими анализами прогнозирования

связывания пептида HLA. Вкратце, белковые последовательности, например, из микробных компонентов или антигенов или компонентов опухолевых клеток или опухолевых антигенов, исследуют на наличие МНС-связывающих мотивов. Эти связывающие мотивы, которые существуют для каждого аллеля МНС, являются консервативными аминокислотными остатками, как правило, в положениях 2 (или 3) и 9 (или 10) для связывающих пептидов МНС класса I, которые обычно имеют 9-10 остатков в длину. Затем готовят синтетические пептиды, которые содержат последовательности, несущие МНС-связывающие мотивы, и в дальнейшем такие пептиды анализируют на их способность связываться с молекулами МНС. Анализ связывания МНС можно проводить либо с использованием клеток, которые экспрессируют большое число пустых (незанятых) молекул МНС (клеточный анализ связывания), или с использованием очищенных молекул МНС. И наконец, МНС-связывающие пептиды затем анализируют на предмет их способности индуцировать ответ CTL у индивидуумов, не получавших лечения, либо с использованием человеческих лимфоцитов in vitro, либо с использованием HLA-трансгенных животных in vivo. Эти CTL анализируют с использованием пептид-сенсибилизированных клеток-мишеней, и мишеней, которые естественным образом обрабатывают антиген, таких как клетки, инфицированные вирусом, или опухолевые клетки. Для дополнительного подтверждения иммуногенности, пептид может быть проанализирован с использованием трансгенной мышиной модели HLA A2 и/или любого из множества анализов стимуляции in vitro.

[00194] В некоторых вариантах реализации изобретения иммуноген (т.е. антиген онкогенного вируса или антиген, ассоциированный с опухолью) включает виды полипептидов, которые имеют одну или более аминокислотных замен, вставок или делеций в аминокислотной последовательности, которая известна и доступна в данной области техники для соответствующего иммуногена. Консервативные замены аминокислот хорошо известны и могут происходить естественным путем в полипептиде или могут быть введены, если полипептид получают рекомбинантно. Аминокислотные замены, делеции и добавления могут быть введены в полипептид с использованием хорошо известных и используемых в повседневной

практике способов мутагенеза (см., например, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 2001)). Олигонуклеотид-направленные сайт-специфические (или сегмент-специфические) процедуры мутагенеза могут быть использованы для получения измененного полинуклеотида, который имеет специфические кодоны, измененные согласно желаемой замены, делеции или вставки. Делеционные или укороченные варианты иммуногенов также могут быть сконструированы с использованием обычных сайтов рестрикционных эндонуклеаз, смежных с желаемой делецией. После рестрикции "липкие концы" могут быть заполнены, и ДНК повторно лигированной. В альтернативном варианте способы случайного мутагенеза, такие как аланин-сканирующий мутагенез, мутагенез с подверженной ошибкам полимеразной цепной реакцией и олигонуклеотид-направленный мутагенез, могут быть использованы для получения вариантов иммуногенного полипептида (см., например, Sambrook et al., выше). Варианты конкретного иммуногена (или его полипептидного фрагмента) включают полипептидный иммуноген, который имеет по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентичность аминокислотной последовательности с любой из приведенных в качестве примера аминокислотных последовательностей, известных в данной области техники.

[00195] Эти варианты полипептидного иммуногена сохраняют способность индуцировать иммунный ответ статистически, клинически и биологически значимым образом (например, гуморальный ответ (т.е. ответ В-клеток) или клеточно-опосредованный ответ (т.е. Т-клеточный ответ (включая цитотоксический Т-клеточный ответ)) или как гуморальный, так и клеточно-опосредованный ответ у субъекта. С учетом широких возможностей молекулярной биологии экспрессия белка, технологии и способы изоляции белка, обычно используемые в данной области техники для введения мутаций в полипептид, приготовление полипептидных фрагментов, изоляция фрагментов и вариантов, и анализ тех же вариантов и фрагментов иммуногенного полипептида, имеющих желаемую способность индуцировать иммунный ответ, могут легко быть осуществлены и без излишних экспериментов.

[00196] С помощью множества критериев, известных специалистам в данной области техники, определяют, является ли аминокислота, которая замещена в определенном положении в пептиде или полипептиде, консервативной (или аналогичной). Например, аналогичная аминокислота или консервативная аминокислотная замена представляет собой ту, в которой аминокислотный остаток замещается аминокислотным остатком с аналогичной боковой цепью. Аналогичные аминокислоты могут быть включены в следующих категориях: аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин); аминокислоты с кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота); аминокислоты с незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, гистидин); аминокислоты с неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан); аминокислоты с бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и аминокислоты с ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан). Пролин, который рассматривается как более трудный для классификации, имеет свойства аминокислот с алифатическими боковыми цепями (например, лейцин, валин, изолейцин и аланин). В некоторых случаях замену глутамина на глутаминовую кислоту или аспарагина на аспарагиновую кислоту можно считать аналогичной заменой, поскольку глутамин и аспарагин являются амидные производные глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты соответственно. Как известно в данной области техники, "аналогичность" между двумя полипептидами определяется путем сравнения аминокислотной последовательности и консервативных аминокислотных замен к ней в полипептиде с последовательностью второго полипептида (например, с использованием GENEWORKS, Align, алгоритма BLAST или других алгоритмов, описанных в настоящем документе и применяемых в данной области техники).

[00197] Согласно настоящему описанию относительно иммуногенных фрагментов, анализы для оценки того, складывается ли соответствующий вариант в конформацию, сопоставимую с

невариантным полипептидом или фрагментом, включают, например, способность белка вступать в реакцию с моно- или поликлональными антителами, которые являются специфическими для нативных или нескладчатых эпитопов, анализ поддержания других лиганд-связывающих функций, а также анализ чувствительности или устойчивости полипептидного фрагмента к расщеплению протеазами (см., Sambrook et al., выше). Такие варианты могут быть идентифицированы, охарактеризованы и/или осуществлены согласно способам, описанным в настоящем документе, или другим способам, известным в данной области техники, которые обычно используются специалистами в данной области техники.

[00198] Иммуногенные композиции, которые вводят субъекту согласно способам, описанных в настоящем документе, могут включать по меньшей мере одно фармацевтическое (или физиологически) приемлемое вспомогательное вещество. Любое физиологически или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество или носитель (т.е. нетоксичный материал, который не влияет на активность активного ингредиента), известный обычным специалистам в данной области техники для использования в фармацевтических композициях, может быть использован в иммуногенных композициях, описанных в настоящем документе. Типичные вспомогательные вещества включают разбавители и носители, которые поддерживают стабильность и целостность белков. Вспомогательные вещества для терапевтического применения хорошо известны и описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro, 21st Ed. Mack Pub. Co., Easton, PA (2005)), и описаны в настоящем документе более подробно.

Композиции и способы лечения рака

[00199] Любая из композиций из описанных в настоящем документе может быть использована в способе лечения человека или животного. Способ может включать введение композиции субъекту, как описано в настоящем документе.

[00200] В одном варианте реализации настоящего изобретения предлагаются способы лечения рака путем индуцирования иммунного ответа, специфичного к рак-ассоциированному антигену,

необязательно - в комбинации с одним или более другими антигенами. В частности, предлагаемые в настоящем документе способы включают индуцирование у субъекта иммунного ответа, специфического для иммуногена, путем введения субъекту, имеющего для этого показания, композиции, содержащей векторную частицу, содержащую рекомбинантный экспрессионный вектор, причем рекомбинантный экспрессионный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий иммуноген (также называемую в настоящем документе первой композицией или иммуногенной композицией), при этом полинуклеотид функционально связан по меньшей мере с одной регулирующей экспрессию последовательностью. Одновременно или последовательно вводят субъекту вторую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый адъювант (также называемую в настоящем документе адъювантной композицией), по существу, лишенную антигена. В некоторых вариантах реализации вторая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый адъювант, может также содержать иммуноген. Как правило, первую "прайм"-композицию вводят системно (например, путем внутрикожного, внутримышечного или подкожного введения), а вторую композицию (например, адъювантную композицию) вводят местно, например, внутриопухолево, перитуморально, интранодально, перинодально, через слизистую оболочку или внутрипузырно.

[00201] В одном варианте реализации настоящего изобретения предлагаются способы лечения вирус-индуцированного рака путем индуцирования иммунного ответа, специфичного к антигену онкогенного вируса, необязательно - в комбинации с опухолеассоциированным антигеном, при этом рак ассоциирован с онкогенным вирусом. В частности, предлагаемые в настоящем документе способы включают индуцирование у субъекта иммунного ответа, специфического для иммуногена, путем введения субъекту, имеющего для этого показания, композиции, содержащей векторную частицу, содержащую рекомбинантный экспрессионный вектор, причем рекомбинантный экспрессионный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий иммуноген (также называемую в настоящем документе первой композицией или иммуногенной композицией), при этом полинуклеотид функционально связан по меньшей мере с одной

регулирующей экспрессию последовательностью. Одновременно или последовательно вводят субъекту вторую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый адъювант (также называемую в настоящем документе адъювантной композицией). В некоторых вариантах реализации изобретения вторая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый адъювант, может также содержать иммуноген. В некоторых вариантах реализации изобретения первая композиция содержит антиген онкогенного вируса и ее вводят системно (например, путем внутрикожного, внутримышечного или подкожного введения). Вторую композицию (например, адъювантную композицию) в некоторых вариантах реализации изобретения вводят местно, например, внутриопухолево или внутривезикально, и она необязательно может содержать антиген или антигены онкогенного вируса, вводимые в первой композиции, и/или опухолеассоциированный антиген, как описано в настоящем документе.

[00202] В одном варианте реализации настоящего изобретения предлагаются способы лечения рака мочевого пузыря путем индуцирования у субъекта иммунного ответа, специфического для иммуногена, с помощью введения субъекту, имеющего для этого показания, композиции, содержащей векторную частицу, содержащую рекомбинантный экспрессионный вектор, причем рекомбинантный экспрессионный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий иммуноген (также называемую в настоящем документе первой композицией или иммуногенной композицией), при этом полинуклеотид функционально связан по меньшей мере с одной регулирующей экспрессию последовательностью. Одновременно или последовательно вводят субъекту вторую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый адъювант (также называемую в настоящем документе адъювантной композицией).

[00203] В способах, описанных в настоящем документе, адъювантная композиция может включать или не включать БЦЖ, согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения. Адъювантная композиция может вводиться за один раз и в достаточном количестве для усиления адъювантом иммунного ответа на иммуноген; то есть уровень иммунного ответа, специфического

для иммуногена (т.е. гуморального ответа, клеточно-опосредованного ответа или и гуморального и клеточно-опосредованного ответов) становится выше (или увеличивается) статистически, биологически или клинически значимым образом по сравнению с уровнем иммунного ответа, специфического для иммуногена, при введении иммуногена в отсутствие адъюванта. В тех случаях, когда антиген не способен индуцировать определяемый специфический иммунный ответ в отсутствие адъюванта, индуцирование определяемого специфического иммунного ответа обозначает усиление иммунного ответа. В других вариантах реализации изобретения адъювантная композиция вводится за один раз и в достаточном количестве для вовлечения адъювантом Т-клеток (например, CD8 Т-клеток, индуцированных последующим введением первой иммуногенной композиции) в место локального введения (например, в опухоль или на слизистую оболочку мочевого пузыря).

[00204] Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения, первая иммуногенная композиции, действует как "прайм"-композиция или необязательно как "прайм/буст"-композиция (см., например, WO2012/141984, который описывает схемы "прайм-буст", применяемые в настоящем изобретении). Первая иммуногенная композиция содержит векторную частицу и/или рекомбинантный экспрессионный вектор и необязательно - адъювант, такой как агонист TLR, описанный в настоящем документе. Как описано в настоящем документе, векторная частица/экспрессионный вектор и необязательно - адъювант могут состоять в одних и тех же или различных композициях, и их можно вводить в одни и те же или различные места, в одно и то же или различное время и с помощью одних и те же или различных путей. В некоторых вариантах реализации изобретения вторая композиция или адъювантная композиция, содержит адъювант и необязательно - БЦЖ. Адъювант и БЦЖ, согласно различным вариантами реализации настоящего изобретения, могут состоять в одних и тех же или различных композициях, и их можно вводить в одни и те же или различные места, в одно и то же или различное время и с помощью одних и те же или различных путей. В некоторых вариантах реализации

изобретения вторая композиции, или адъювантная композиция, содержит адъювант и необязательно - БЦЖ и/или опухолеассоциированный антиген, например, антиген, ассоциированный с раком мочевого пузыря.

[00205] Индуцирование иммунного ответа с помощью способов иммунизации "прайм-пулл" и иммуногенных композиций, описанных в настоящем документе, может быть осуществлено путем использования множества различных схем. Типичный, не исчерпывающий перечень схем иммунизации включает введение:

a) первой композиции, содержащей экспрессионный вектор, который кодирует и экспрессирует иммуноген; и/или

b) первой композиции, содержащей экспрессионный вектор, который кодирует и экспрессирует иммуноген, а также содержащей адъювант;

c) первой композиции, содержащей аутологичные или гетерологичные Т-клетки, специфические к опухолевому антигену, которые были увеличены в количестве *ex vivo*, генетически модифицированы химерным рецептором антигена с целью распознавания опухолеассоциированного антигена (CAR-Т-клетки), или Т-клетки, генетически модифицированные для экспрессии специфического химерного Т-клеточного рецептора (CAR-TCR-клетки), распознающего эпитоп, ассоциированный с раком, в контексте МНС;

причем либо a), либо b), либо c) вводят множество раз, в любом порядке (по отношению друг к другу), и их можно вводить одновременно, последовательно и в различные или одни и те же места и с помощью различных или одних и тех же путей, как и последующие вторые композиции:

i) композиции, содержащей адъювант без иммуногена;

ii) композиции, содержащей адъювант с БЦЖ;

iii) композиции, содержащей адъювант с иммуногеном; и/или

iv) композиции, содержащей адъювант с иммуногеном и БЦЖ.

[00206] Несмотря на то, что типичные схемы, описанные в настоящем документе, описаны как схемы "прайм-пулл", будет понятно, что композиции, представленные выше, могут вводиться множество раз, в любом порядке, и их можно вводить одновременно,

последовательно, в различные или одни и те же места и с помощью различных или одних и тех же путей введения. В качестве одного неограничивающего примера, настоящее изобретение предусматривает "прайм"-введение композиции либо a), либо b), либо c), описанных выше; необязательно - одно или более "буст"-введения композиции либо a), либо b), либо c), описанных выше, и "пулл"-введение любой из композиций i) -iv), описанных выше. "Прайм"-, "буст"- и "пулл"- введения/композиции могут вводится множество раз, в любом порядке, и могут вводится одновременно, последовательно, в различные или одни и те же места и с помощью различных или одних и тех же путей введения. "Буст"-композиция в некоторых вариантах реализации изобретения содержит адъювант, как описано в настоящем документе, в комбинации с иммуногеном, в конкретных вариантах реализации изобретения тот же иммуноген экспрессирован экспрессионным вектором в первой композиции (прайм), который кодирует и экспрессирует иммуноген.

[00207] В некоторых вариантах реализации изобретения способы, описанные в настоящем документе, включают введение адъюванта и рекомбинантного экспрессионного вектора в одной и той же композиции. В других вариантах реализации изобретения способы, описанные в настоящем документе, включают введение адъюванта и рекомбинантного экспрессионного вектора в двух отдельных композициях, либо в разное время, в разные места и/или с помощью различных путей введения. В некоторых других вариантах реализации изобретения векторная частица, содержащая рекомбинантный экспрессионный вектор, кодирующий иммуноген(ы), представляющий(е) интерес, и адъювант не объединены вместе в одну композицию. Другими словами, композиция, содержащая векторную частицу, которая включает рекомбинантный экспрессионный вектор, кодирующий иммуноген (например, иммуногенная композиция), не содержит адъювант, а композиция, содержащая адъювант, не содержит рекомбинантный экспрессионный вектор или не содержит векторную частицу, имеющую вектор, который кодирует иммуноген, представляющий интерес. В других конкретных вариантах реализации способов, описанных в настоящем документе, когда композицию, содержащую вектор, кодирующий

иммуноген, и композицию, содержащую адъювант, вводят в одно и то же время (т.е. параллельно), каждую композицию вводят в разные места. Когда каждую композицию вводят в разные места, каждая композиция может быть введена с помощью одних и тех же или различных путей. В альтернативном варианте каждая композиция может вводиться с помощью различных путей в одно и то же место. В дополнительных вариантах реализации изобретения адъювант и рекомбинантный экспрессионный вектор вводят в одной и той же композиции.

[00208] В некоторых вариантах реализации изобретения "пулл"-композицию (например, композицию, содержащую агонист TLR4) можно вводить в один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более локальных участков, либо одновременно, либо последовательно (либо одновременно или последовательно между собой, либо одновременно или последовательно с "прайм"-введением; или использовать оба варианта). В качестве одного примера, антиген-специфический иммунный ответ, вызванный "прайм"-введением, может быть "подтянут" ("пулл") к одной или более опухолям, например, к месту первичной опухоли и/или одному или более метастатическим опухолевым участкам при местном (например, перитуморально или внутриопухолево) введении композиции, содержащей соответствующий адъювант (например, агонист TLR4, такой как GLA, описанный в настоящем документе). В качестве дополнительного неограничивающего примера, в некоторых вариантах реализации изобретения место первичной опухоли может быть недоступным для "пулл"-введения композиции, но один или более метастатических участков могут быть доступны. В некоторых вариантах реализации изобретения введение в один или более локальных участков опухоли вызывает инфильтрацию опухоли антиген-специфическими Т-клетками в месте введения "пулл"-композиции, а в некоторых вариантах реализации изобретения также наблюдается тормозящий эффект, при котором введение в один локальный участок опухоли также приводит к инфильтрации участка отдаленной опухоли Т-клетками и уменьшение размера отдаленной опухоли.

[00209] В некоторых вариантах реализации изобретения

иммуногенную "прайм"-композицию (например, композицию, содержащую лентивирусный вектор, кодирующий антиген, ассоциированный с раком, и необязательно включающую один или более других антигенов, или композицию, содержащей адоптивно перенесенне Т-клетки, антиген-специфические или генетически модифицированные CAR-Т-клетки) и адъювантную "пулл"-композицию (например, композицию, содержащую агонист TLR4) вводят субъекту одновременно. Когда "прайм"- и "пулл"-композиции вводят одновременно, композиции вводят с интервалом от 5 до 120 минут между первой и второй. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенную композицию ("прайм") вводят в пределах одного часа с адъювантной композицией ("пулл"). Как правило, одновременное введение представляет собой введение в диапазоне короткого периода времени, так, как это возможно для безопасного и приемлемого введения для пациента и медицинского персонала. В вариантах реализации изобретения, в которых "прайм"-композиция содержит адоптивно перенесенные Т-клетки, введение композиции, содержащей Т-клетки, может осуществляться в течение определенного периода времени (например, инфузия Т-клеток может происходить в течение одного часа, двух часов, трех часов), а одновременное введение "пулл"-композиции впоследствии завершает инфузию клеток, но, как правило, осуществляется в пределах от 5 до 120 минут после инфузии или в безопасный для пациента способ и определяется клиницистом.

[00210] В вариантах реализации изобретения, в которых "прайм"- и "пулл"-композиции вводят одновременно, иммуногенная композиция ("прайм") может вводиться с помощью одного пути (т.е. первого пути), а адъювантную композицию вводят с помощью второго, отличающегося, пути. В одном варианте реализации изобретения "прайм"-композицию вводят системно (например, путем внутрикожного, внутримышечного или подкожного введения), а "пулл"-композицию вводят местно, например, внутриопухолево, перитуморально, интранодально, внутрипузырно). Пути введения, из которых первый и второй пути могут быть независимо друг от друга выбраны, включают, но не ограничиваются ими, местный, пероральный, энтеральный, назальный (т.е. интраназальный),

ингаляционный, интратекальный, ректальный, вагинальный, внутриглазной субконъюнктивальный, сублингвальный, внутрикожный, трансдермальный пути или парентеральное введение, включая подкожную, чрезкожную, внутривенную, внутримышечную, внутриопухолевую, интранодальную, внутригрудинную, интракавернозную, внутрипузырную, внутриканальную или интрауретральную инъекцию или инфузию. В некоторых более конкретных вариантах реализации настоящего изобретения первый и второй пути разные, и каждый из них выбирается из парентерального, перорального, энтерального, сублингвального, интраназального, внутримышечного, внутрикожного, подкожного, внутриопухолевого, интранодального, чрезкожного, трансдермального, внутрипузырного и местного. В более конкретных вариантах реализации настоящего изобретения первый и второй пути разные и выбираются из внутримышечного, внутрикожного, подкожного, чрезкожного, внутриопухолевого, интранодального, интраназального, внутрипузырного и перорального. В еще одном варианте реализации изобретения первую иммуногенную композицию вводят внутрикожно, внутримышечно или подкожно без адъюванта, а адъювантную композицию вводят местно в участок раковой опухоли, например, внутриопухолево или внутрипузырно, с иммуногеном или без него, а в некоторых вариантах реализации изобретения, таких как лечение рака мочевого пузыря, с БЦЖ или без нее. Иммуногенные и адъювантной композиции составлены соответствующим образом для доставки с помощью различных путей, как это известно в данной области техники и более подробно описано в настоящем документе.

[00211] В других вариантах реализации изобретения, описанных в настоящем документе, в которых иммуногенную "прайм"-композицию и адъювантную композицию вводят субъекту одновременно, композиции могут быть введены субъекту в разные места. Разные места являются в достаточной степени физически отделенными друг от друга с целью обеспечения индуцирования или усиления иммунного ответа на иммуноген. Когда каждую композицию вводят в разные места, композиция может быть введена с помощью одного и того же пути или может быть введена с помощью различных

путей. В качестве примера и только в целях иллюстрации, иммуногенную композицию может быть введена внутримышечно или подкожно в конечность субъекта (например, в руку), а адъювантная композиция может быть введена подкожно или внутримышечно, соответственно, в другую конечность субъекта (например, в ногу). В качестве дополнительного примера, введение каждой композиции одновременно в разные места, но с помощью того же пути может включать введение иммуногенной композиции в конечность (например, в руку или в ногу) и введение адъювантной композиции в другую (или вторую) конечность одного и того же типа. В других конкретных вариантах реализации изобретения, когда иммуногенную композицию и адъювантную композицию вводят одновременно в одно и то же место, пути введения для иммуногенной и адъювантной композиций являются различными и каждая из них выбирается из перорального, энтерального, парентерального, внутримышечного, внутрикожного, подкожного, внутриопухолевого, интранодального, чрезкожного, трансдермального, сублингвального, внутрипузырного и местного пути введения. В качестве примера, одна композиция может быть введена перорально для проглатывания, а вторая композиция может быть введена сублингвально. В качестве другого примера, одна композиция может быть введена внутримышечно в место введения, а вторая композиция вводится подкожно или чрезкожно приблизительно в то же место (например, в ту же руку или ту же ногу).

[00212] Выбор пути введения будет зависеть от целого ряда факторов, включая вводимую композицию, возраста субъекта и массу тела субъекта. Путь введения и место введения, как правило, выбираются, чтобы максимизировать количество активного ингредиента в композиции, вводимой субъекту наиболее безопасным способом. Типичные места для внутримышечного введения иммуногенной композиции и/или адъювантной композиции включают переднелатеральную мышцу бедра и дельтовидную мышцу. В клинической практике внутримышечные инъекции в дельтовидную мышцу, как правило, применяются специалистами в области вакцинирования для введения вакцины взрослым, а также в некоторых случаях - детям, подросткам и детям младшего возраста

от 1 до 2 лет. Латеральная широкая мышца в переднебоковой поверхности бедра, как правило, рекомендуется для внутримышечной инъекции детей грудного возраста (т.е. менее одного года), а также может быть местом внутримышечного введения у детей старшего возраста и взрослых. В альтернативном варианте местом внутримышечной инъекции в организме человека может быть вентро-ягодичная область. Специалист в данной области техники должен понимать, что доставка вакцины может быть недостаточной, если иммуногенную композицию вводят в дорсо-ягодичную область или верхний наружный квадрант ягодицы.

[00213] В качестве примера, внутрипузырное введение адъювантной композиции, описанной в настоящем документе, включает введение композиции непосредственно в мочевой пузырь (например, через катетер), а не применение ее перорально или путем внутривенной инъекции. Композиции, введенные таким образом, в первую очередь влияют на клетки, выстилающие мочевой пузырь (слизистую оболочку). Могут понадобится многократные введения адъювантной композиции, поскольку проницаемость уротелиального слоя является очень низкой и инстиллированные растворы лекарственного средства могут разбавляться мочой и вымываться из мочевого пузыря во время мочеиспускания. В различных вариантах реализации изобретения усилители проницаемости, такие как хитозан и диметилсульфоксид, могут быть использованы для временного нарушения плотности укладки уротелия, а наноносители, такие как липосомы, наночастицы желатина, полимерные наночастицы и магнитные частицы могут быть использованы для повышения локальных концентраций лекарственного средства в мочевом пузыре, а также пораженных клетках-мишенях. В других вариантах реализации изобретения интравезикальные носители лекарственных средств оптимизируются путем использования мукоадгезионных материалов, которые сильно прилипают к уротелиальным клеток выстилки, предотвращая таким образом вымывание носителя во время мочеиспускания. Полимерные гидрогели, такие как чувствительный к температуре полимер PEG-PLGA-PEG, использованы для разработки желирующих систем *in situ* для доставки лекарственных веществ в полость мочевого пузыря

(GuhaSarkar, S., et al., J Control Release. 2010 Dec 1;148(2):147-59).

[00214] В качестве примера, типичные места для подкожного введения иммуногенной или адъювантной композиции включают жировую ткань над мышечной переднелатеральной мышцей бедра или жировую ткань над трицепсами. Бедренная мышца является предпочтительным местом для подкожного введения композиции для грудного ребенка. Чрезкожнное введение может осуществляться в дельтовидную мышцу или в переднелатеральную мышцу бедра.

[00215] В другом варианте реализации изобретения первая композиция, содержащая векторную частицу, включающую рекомбинантный экспрессионный вектор, который содержит полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один иммуноген, и вторая композиция, содержащая адъювант, вводятся последовательно. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенную композицию вводят до адъювантной композиции (т.е. адъювантная композиция вводится после введения иммуногенной композиции). В других конкретных вариантах реализации изобретения адъювантную композицию вводят перед введением иммуногенной композиции (т.е. иммуногенная композиция вводятся после введения адъювантной композиции).

[00216] В некоторых вариантах реализации изобретения, в которых "прайм"-композиция содержит адоптивно перенесенные Т-клетки, "прайм"-композиция и пригодная "пулл"-композиция, такая как агонист TLR4 (например, GLA) или другая адъювантная композиция, как описано в настоящем документе, вводятся в одно и то же время или могут быть введены последовательно. Многократные введения адаптивно перенесенных клеток могут производится до введения "пулл"-композиции.

[00217] Таким образом, в настоящем изобретении предлагается способ лечения рака у субъекта путем 1) введения субъекту первой композиции, содержащей Т-клетки, специфические к опухолеассоциированному антигену, которые были увеличены в количестве или модифицированы *ex vivo*, генетически модифицированные CAR-Т-клетки, которые были генетически модифицированы с целью распознавания опухолеассоциированного

антигена или Т-клетки, генетически модифицированы для экспрессии специфического химерного Т-клеточного рецептора (TCR), распознающего эпитоп, ассоциированный с раком, в контексте MHC; 2) местного или внутриопухолевого введения субъекту, либо одновременно, либо последовательно, второй композиции, содержащей фармацевтически приемлемый адъювант, как описано в настоящем документе, для подтягивания адоптивно перенесенных клеток к опухоли; тем самым осуществляя лечение рака у субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения адоптивно перенесенные клетки могут быть бустированы путем введения субъекту экспрессионного вектора, как описано в настоящем документе, перед местным введением второй композиции с целью подтягивания адоптивных (а затем бустированных) клеток к локальному участку (например, в опухоль).

[00218] В вариантах реализации изобретения, в которых иммуногенную композицию и адъювантную композицию вводят последовательно субъекту, имеющего для этого показания, каждое введение отделяется интервалом в несколько часов или дней. В случаях, когда адъювантная композиция вводится последовательно с иммуногенной композицией, адъювантную композицию вводят с таким интервалом времени, чтобы сформировался иммунный ответ, индуцированный адъювантной композицией в месте введения. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенная композиция вводится по меньшей мере за один, по меньшей мере за два, по меньшей мере за три, по меньшей мере за четыре, по меньшей мере за пять, по меньшей мере за шесть, по меньшей мере за семь, по меньшей мере за восемь, по меньшей мере за девять, по меньшей мере за десять или по меньшей мере за 12 часов, или по меньшей мере за 18 часов до введения адъювантной композиции. В других конкретных вариантах реализации изобретения иммуногенную композицию вводят по меньшей мере за один, по меньшей мере за два, по меньшей мере за три, по меньшей мере за четыре, по меньшей мере за пять, по меньшей мере за шесть или по меньшей мере за семь дней до введения адъювантной композиции. В других вариантах реализации изобретения иммуногенную композицию вводят от одного до 36 дней до введения адъювантной композиции.

Иммуногенная композиция может быть введена за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 дней до введения адъювантной композиции. В дополнительных некоторых вариантах реализации изобретения адъювантная композиция вводится перед иммуногенной композицией по меньшей мере за один, по меньшей мере за два, по меньшей мере за три, по меньшей мере за четыре, по меньшей мере за пять, по меньшей мере за шесть, по меньшей мере за семь, по меньшей мере за восемь, по меньшей мере за девять, по меньшей мере за десять, или по меньшей мере за 12 часов, или по меньшей мере за 18 часов до введения иммуногенной композиции. В других вариантах реализации изобретения, описанных в настоящем документе, адъювантная композиция вводится перед иммуногенной композицией и вводится по меньшей мере за один, по меньшей мере за два, по меньшей мере за три, по меньшей мере за четыре, по меньшей мере за пять, по меньшей мере за шесть, или по меньшей мере за семь дней до введения иммуногенной композиции. В других вариантах реализации изобретения адъювантную композицию вводят от одного до 36 дней до введения иммуногенной композиции. Адъювантная композиция может быть введена за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 дней до введения иммуногенной композиции. Оптимальный интервал времени между введениями каждой композиции может быть определен специалистом в данной области техники, путем анализа доклинических и клинических исследований, разработанных надлежащим образом. Оптимальный интервал времени может зависеть от иммуногена, представляющего интерес, и/или конкретного вводимого адъюванта.

[00219] В других вариантах реализации изобретения иммуногенная композиция и адъювантная композиция вводятся последовательно субъекту, имеющего для этого показания, более чем один раз (например, два раза, три раза или четыре раза). В конкретном варианте реализации изобретения адъювантная композиция может вводиться то же количества раз, что и иммуногенная композиция. В еще одном варианте реализации

изобретения адъювантная композиция может вводиться меньшее количество раз, чем иммуногенная композиция. В качестве не ограничивающего примера, когда иммуногенная композиция вводится более чем один раз, адъювантная композиция может быть введена только до или после первого введения иммуногенной композиции, но не до или после любого последующего (т.е. второго, третьего или четвертого) введения иммуногенной композиции. В еще одном конкретном варианте реализации изобретения адъювантная композиция может вводиться большее количество раз, чем иммуногенная композиция.

[00220] В других вариантах реализации изобретения адъювантная композиция может быть введена по меньшей мере на один раз больше, чем иммуногенная композиция. Например, адъювант способен индуцировать врожденный (или неспецифический) иммунный ответ и может быть введен в достаточном временном интервале до или после введения иммуногенной композиции для индуцирования или стимуляции врожденного иммунного ответа. Не желая быть связанными теорией, этот ответ включает локальную индукции цитокинов и хемокинов, которые вовлекают антиген-специфические Т-клетки в место введения. Адъювантная композиция также может затем быть введена одновременно (это одновременное введение может осуществляться в другое место или с помощью другого пути) или последовательно с первым введением иммуногенной композиции.

[00221] Когда адъювантную композицию и иммуногенную композицию вводят последовательно, каждую из композиций можно вводить с помощью того же пути или можно вводить с помощью различных путей. Пути введения для доставки как адъювантной, так и иммуногенной композиции могут быть независимо друг от друга выбраны и включают, но не ограничиваются ими, местный, пероральный, энтеральный, назальный (т.е. интраназальный), ингаляционный, интратекальный, ректальный, вагинальный, внутриглазной субконъюнктивальный, сублингвальный, внутрикожный, внутриопухолевый, перитуморальный, интранодальный, перинодальный, трансдермальный пути или парентеральное введение, включая подкожную, чрезкожную, внутривенную, внутримышечную, внутригрудинную, интракавернозную, внутрипузырную,

внутриканальную или интрауретральную инъекцию или инфузию. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения первый и второй пути разные, и каждый из них выбирается из парентерального, перорального, энтерального, сублингвального, интраназального, внутримышечного, внутрикожного, внутриопухолевого, интранодального, подкожного, чрезкожного, трансдермального и местного.

[00222] Когда адъювантную композицию и иммуногенную композицию вводят субъектус помощью одного и того же пути, каждая из композиций может быть введена субъекту в одно и то же место, или может быть введена субъекту в различные места. В других конкретных вариантах реализации изобретения, когда адъювантную композицию и иммуногенную композицию вводят последовательно, каждую из композиций можно вводить с помощью различных путей, но в участки, размещенные в достаточной мере проксимально для того, чтобы считаться одним и тем же местом. В качестве неограничивающего примера, иммуногенную композицию можно вводить внутримышечно в конечность субъекта (например, в плечо (в дельтовидную мышцу) или бедро (в бедренную мышцу)), а также до или после введения иммуногенной композиции; адъювантная композиция вводится подкожно в то же место на конечности субъекта (например, в то же плечо (в дельтовидную мышцу) или в то же бедро (в бедренную мышцу), соответственно). В качестве второго неограничивающего примера, адъювантную композицию можно вводить внутримышечно в конечность субъекта (например, в плечо (в дельтовидную мышцу) или бедро (в бедренную мышцу)), а также до или после введения адъювантной композиции; иммуногенная композиция вводится подкожно в то же место на конечности субъекта (например, в то же плечо (в дельтовидную мышцу) или в то же бедро (в бедренную мышцу), соответственно).

[00223] Как обсуждалось в настоящем документе, выбор места и пути введения может зависеть от таких факторов, включая, но не обязательно ограничиваясь этим, возраст, состояние здоровья и/или конституцию субъекта, подлежащего иммунизации; рекомбинантный экспрессионный вектор или векторную частицу, содержащую вектор; иммуноген(ы), кодируемый(е) рекомбинантным

экспрессионным вектором; и/или адъювант. Патологическое состояние, заболевание или нарушение, которое лечат или предотвращают введением иммуногенной композиции, и тип желаемого иммунного ответа могут быть дополнительными факторами, учитываемыми специалистом в данной области техники при определении пути введения и места введения с целью максимизации терапевтического и/или профилактического эффекта от иммуногенной и адъювантной композиций.

[00224] В рамках реализации протокола или схемы иммунизации уровень иммунного ответа на иммуноген можно контролировать. Так, количество введений субъекту как иммуногенной композиции, так и адъювантной композиции может быть определено путем мониторинга уровня иммунного ответа на иммуноген после каждого введения иммуногенной композиции. Методики и способы мониторинга иммунного ответа обычно применяются в данной области техники и описаны в настоящем документе и в данной области техники.

Иммунный ответ

[00225] Согласно настоящему описанию предлагаются способы индуцирования иммунного ответа на иммуноген, и в конкретных вариантах реализации изобретения - для привлечения или набора индуцированных клеток в область, представляющую интерес (например, в опухоль, участок инфицированной слизистой оболочки). Клетки иммунной системы, которые вовлечены в иммунный ответ, относятся, как правило, к иммунным клеткам, и включают лимфоцит и нелимфоидную клетку, такую как вспомогательная клетка. Лимфоциты представляют собой клетки, которые специфически распознают и реагируют на чужеродные антигены, а вспомогательные клетки являются такими, которые не являются специфическими для определенных антигенов, но участвуют в когнитивной и активационной фазах иммунного ответа. Например, мононуклеарные фагоциты (макрофаги), другие лейкоциты (например, гранулоциты, в том числе нейтрофилы, эозинофилы, базофилы) и дендритные клетки функционируют как вспомогательные клетки при индуцировании иммунного ответа. Активация лимфоцитов чужеродным антигеном приводит к индуцированию или получению многочисленных эффекторных механизмов, которые функционируют с целью устранения

этого антигена. Вспомогательные клетки, такие как мононуклеарные фагоциты, которые влияют на эффекторные механизмы или вовлечены в них, также называются эффекторными клетками.

[00226] Основные классы лимфоцитов включают В-лимфоциты (В-клетки), Т-лимфоциты (Т-клетки) и природные клетки-киллеры (NK), которые являются большими гранулярными лимфоцитами. В-клетки способны продуцировать антитела. Т-лимфоциты дополнительно подразделяются на Т-хелперы (CD4+ (также называемые в настоящем документе и в данной области техники как CD4)) и цитолитические или цитотоксические Т-клетки (CD8+ (также называемый в настоящем документе и в данной области техники как CD8)). Т-клетки также описаны в данной области техники как антиген-специфические Т-клетки CD4 и/или CD8, эффекторные Т-клетки памяти (T_{EM}), центральные Т-клетки памяти (T_{CM}) и/или ткане-резидентные Т-клетки памяти (T_{RM}). Клетки-хелперы секретируют цитокины, которые способствуют пролиферации и дифференцировке Т-клеток и других клеток, включая В-клетки и макрофаги, а также вовлечению и активации воспалительных лейкоцитов. Другая подгруппа Т-клеток, называемых регуляторными Т-клетками или Т-клетками-супрессорами, активно подавляют активацию иммунной системы и предотвращают патологическую аутореактивность, то есть аутоиммунное заболевание.

[00227] Описанные в настоящем документе способы индуцирования иммунного ответа могут индуцировать гуморальный ответ, называемый в данном описании и в данной области техники также В-клеточным ответом, или может индуцировать клеточный иммунный ответ с участием различных типов Т-клеток (т.е. Т-лимфоцитов). Гуморальный ответ включает продукцию антител, которые специфически связываются с антигеном (или иммуногеном). Антитела, продуцируемые дифференцированными В-лимфоцитами, известны как плазматические клетки. При клеточно-опосредованном ответе различные типы Т-лимфоцитов функционируют с целью устранения антигена с помощью множества механизмов. Например, Т-хелперы, которые способны распознавать специфические антигены, могут реагировать путем высвобождения растворимых медиаторов, таких как цитокины, с целью вовлечения дополнительных клеток

иммунной системы для участия в иммунном ответе. Также, цитотоксические Т-клетки способны распознавать специфические антигены и могут реагировать путем связывания, уничтожения или повреждения антиген-несущей клетки или частицы.

[00228] Иммунный ответ у хозяина или субъекта может быть определен с помощью любого количества хорошо известных иммунологических методов, описанных в настоящем документе, и которые будут понятны обычным специалистам в этой области техники. Как описано в настоящем документе, методы и способы для определения наличия и уровня иммунного ответа включают, например, резонансный перенос энергии флуоресценции, поляризацию флуоресценции, времяразрешенный флуоресцентный индуктивно-резонансный перенос энергии, сцинтилляционный анализ сближения, анализы репортерных генов, анализ флуоресцентного подавленного ферментного субстрата, анализ хромогенного ферментного субстрата и электрохемилюминесценцию, иммунологические анализы (например, иммуносорбентные ферментные анализы (ELISA), радиоиммунный анализ, иммуноблоттинг, иммуногистохимию, и тому подобное), поверхностный плазмонный резонанс, анализы на основе клеток, такие, как те, которые используют репортерные гены, и функциональные анализы (например, анализы, измеряющие иммунную функцию и иммунологическую реактивность).

[00229] Такие анализы включают, но не обязательно должны быть ограничены ими, определение наличия и уровня растворимых антител, растворимых медиаторов in vivo или in vitro, таких как цитокины (например, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-6, IL-23, TNF-α, и TGF-β), лимфокинов, хемокинов, гормонов, факторов роста и т.п., а также других растворимых низкопептидных, углеводных, нуклеотидных и/или липидных медиаторов. Иммунологические анализы также включают определение изменения состояния клеточной активации путем анализа измененных функциональных или структурных свойств клеток иммунной системы, например, пролиферации клеток, измененной моторики, индуцирования специализированных функций, таких как специфическая экспрессия гена или цитолитическая функция; созревания клеток, например,

созревание дендритных клеток в ответ на стимуляцию; изменение в взаимосвязях между Th1-ответом и Th2-ответом; клеточной дифференцировки клетками иммунной системы, включая измененные профили экспрессии поверхностного антигена или начало апоптоза (запрограммированная гибель клетки). Для анализа маркеров клеточной поверхности также доступны другие способы с целью идентификации различных популяций иммунных клеток, таких как, но не ограничиваясь ими, антиген-специфические Т-клетки CD4 и/или CD8, эффекторные Т-клетки памяти (T_{EM}), центральные Т-клетки памяти (T_{CM}) и/или ткане-резидентные Т-клетки памяти (T_{RM}). Процедуры выполнения этих и подобных анализов можно найти, например, в Lefkovits (Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques, 1998). См. также Current Protocols in Immunology; Weir, Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific, Boston, MA (1986); Mishell and Shigii (eds.) Selected Methods in Cellular Immunology, Freeman Publishing, San Francisco, CA (1979); Green and Reed, Science 281:1309 (1998) и приведенные там ссылки).

[00230] Определение наличия и/или уровня антител, которые специфически связываются с иммуногеном, представляющим интерес, может быть осуществлено с помощью любого из нескольких иммунологических анализов, обычно используемых в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, ELISA, иммунопреципитацию, иммуноблоттинг, противоточный иммуноэлектрофорез, радиоиммуноанализы, дот-блот-анализы, анализы ингибирования или конкуренции и тому подобное (см., например, патенты США №№ 4376110 и 4486530; Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)). Иммунологические анализы также могут быть выполнены для определения класса и изотипа антитела, которое специфически связывается с иммуногеном. Антитела (поликлональные и/или моноклональные или их антигенсвязывающие фрагменты), которые специфически связываются с иммуногеном и могут быть использованы в качестве контроля в иммунологических анализах определения антителоспецифичного иммунного ответа в иммунизированного субъекта, как правило, могут быть получены любым из множества

методов, известных обычным специалистам в данной области техники. См., например, Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Peterson, ILAR J. 46:314-19 (2005); (Kohler et al., Nature, 256:495-97 (1976); Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:511-19 (1975); Coligan et al. (eds.), Current Protocols in Immunology, 1:2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991); патенты США №№ 4902614, 4543439 и 4411993; Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett et al. (eds.) (1980); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); см. также, например, Brand et al., Planta Med. 70:986-92 (2004); Pasqualini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:257-59 (2004). Иммуноген или его иммуногенные фрагменты, или клетка или частица, несущая иммуноген, или ее иммуногенный фрагмент могут быть использованы для иммунизации животного с целью продукции либо поликлональных антител, либо моноклональных антител.

[00231] Уровни цитокинов могут быть определены согласно способам, описанным в настоящем документе и используемым в данной области техники, включая, например, ELISA, ELISPOT, внутриклеточное окрашивание цитокинов, проточную цитометрию и их комбинации (например, внутриклеточное окрашивание цитокинов и проточная цитометрия). Пролиферация иммунных клеток и клональная экспансия в результате антиген-специфической индукции или стимуляции иммунного ответа могут быть определены путем выделения лимфоцитов, таких как клетки селезенки или клетки периферической крови, образцы афереза, клетки лимфатических узлов, клетки, стимулированные антигеном, и измерения маркеров клеточной поверхности, продуцирования цитокинов, пролиферации клеток и/или жизнеспособности клеток, например, путем включения меченного тритием тимидина или нерадиоактивных анализов, таких как анализы MTT и тому подобное. Влияние иммуногена, описанного в настоящем документе, на равновесие между иммунным ответом Th1 и иммунным ответом Th2 может быть проанализировано, например, путем определения уровней цитокинов Th1, таких как IFN-γ, IL-12,

IL-2 и TNF-β, и цитокинов типа 2, таких как IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 и IL-13.

[00232] Уровень ответа антиген-специфических Т-клеток, например, уровень иммунного ответа CTL и/или уровень ответ CD4 Т-клеток памяти, может быть определен любым из многочисленных иммунологических способов, описанных в настоящем документе и обычно используемых в этой области техники. Уровень иммунного ответа CTL может быть определен перед введением любой из композиций, векторов или векторных частиц, описанных в настоящем документе, а затем учитывается для сравнения с уровнем иммунного ответа CTL в подходящий момент времени и/или местоположении после одного или более введений композиций, векторов или векторных частиц, что обеспечивает память CD4 Т-хелперов. Анализы цитотоксичности для определения активности CTL могут быть выполнены с использованием любого из нескольких способов и методов, применяемых в повседневной практике в данной области техники (см., например, Henkart et al., "Cytotoxic T-Lymphocytes" in Fundamental Immunology, Paul (ed.) (2003 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA), pages 1127-50 и приведенные в этих документах ссылки).

[00233] Например, когда "прайм"-композиция, включающая векторные частицы, содержащие полинуклеотид, кодирующий иммуноген, и "пулл"-композиция, включающая адъювантную композицию, вводятся согласно способам, описанным в настоящем документе, уровень иммунного ответа CTL, или ответа CD8+ Т-клеток усиливается (улучшается), в частности, в месте введения "пулл"-композиции, содержащей адъювант. Например, усиление на 50% может наблюдаться при измерении с помощью функциональных анализов Т-клеток, таких как внутриклеточное окрашивание цитокинов; ELISPOT; или измерение секреции растворимого цитокина с помощью Luminex в течение 1-4 недель после введения обеих композиций. В связи с этим, как правило, отмечается усиление ответа по сравнению с соответствующим контролем, например, в отсутствие введения композиции, содержащей адъювант, как описано в настоящем документе.

[00234] В конкретных вариантах реализации изобретения усиление в 2-50 раз в локально инфильтрирующих антиген-специфических Т-клетках наблюдается в соответствии со способами, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения наблюдается усиление в 2-40 раз, усиление в 2-30 раз, усиление в 2-20 раз, усиление в 2-10 раз, усиление в 3-8 раз, усиление в 4-7 раз или усиление в 5-6 раз в локально инфильтрирующих (например, инфильтрирующих опухоль) антиген-специфических Т-клетках. Как правило, отмечается усиление ответа локально инфильтрирующих антиген-специфических Т-клеток по сравнению с количеством локально инфильтрирующих антиген-специфических Т-клеток, имеющихся без введения "пулл"-композиции, или по сравнению с соответствующим введением контроля. Как правило, способы настоящего изобретения обеспечивают усиление ответа локально инфильтрирующих антиген-специфических Т-клеток статистически, биологически и/или клинически значимым образом по сравнению с соответствующим контролем в отсутствие введения адъюванта.

[00235] В данном контексте партнер по связыванию или антитело называются "иммуноспецифическими", "специфическими для" или о них сказано, что они "специфически связывают" иммуноген, представляющий интерес, если антитело вступает в реакцию на выявляемом уровне с иммуногеном или его иммуногенным фрагментом, предпочтительно с аффинной константой, Ка, больше или равном около 10^4 M^{-1}, или больше или равном около 10^5 M^{-1}, больше или равном около 10^6 M^{-1}, больше или равном около 10^7 M^{-1} или больше или равном 10^8 M^{-1}. Аффинность антитела к родственному антигену также обычно выражается в виде константы диссоциации KD, и антитело специфически связывается с иммуногеном, представляющим интерес, если оно связывается с KD на уровне, меньше или равном 10^{-4} М, меньше или равном около 10^{-5} М, меньше или равном около10^{-6} М, меньше или равном 10^{-7} М, или меньше или равном 10^{-8} М.

[00236] Аффинность партнеров по связыванию или антител может быть легко определена с использованием обычных методов, например, тех, которые описаны Scatchard et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci. USA 51:660 (1949)) и с помощью поверхностного плазмонного

резонанса (SPR; BIAcore™, Biosensor, Пискатауэй, Нью-Джерси). Для поверхностного плазмонного резонанса молекулы-мишени иммобилизуют на твердой фазе, и подвергают воздействию партнера по связыванию (или лиганда) в подвижной фазе, проходящей вдоль проточной кюветы. Если происходит связывание лиганда с иммобилизованной мишенью, изменяется локальный рефракционный индекс, что приводит к изменению угла SPR, которое можно наблюдать в режиме реального времени путем обнаружения изменений в интенсивности отраженного света. Скорости изменения сигнала SPR могут быть проанализированы с целью получения констант кажущейся скорости ассоциациативной и диссоциативной фазы реакции связывания. Отношение этих величин представляет константу кажущегося равновесия (аффинность) (см., например, Wolff et al., Cancer Res. 53:2560-2565 (1993)).

[00237] Биологический образец может быть получен от субъекта для определения наличия и уровня иммунного ответа на иммуноген у субъекта, который получил композицию, включающую векторную частицу, содержащую рекомбинантный экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один иммуноген, а также композицию, содержащую адъювант согласно способам, описанным в настоящем документе. В данном контексте термин "биологический образец" может представлять собой образец крови (из которого могут быть получены сыворотка или плазма), образец афереза, образец биопсии, жидкости тела (например, жидкость, полученная при лаваже легких, асцитическая жидкость, промывочные жидкости слизистых оболочек, синовиальная жидкость), костный мозг, лимфатические узлы, ткани эксплантов, органную культуру или препарат любых других тканей или клеток субъекта или биологического источника.

[00238] В отношении всех иммунологических анализов и способов, описанных в настоящем документе, для определения иммунного ответа, специалисту в данной области техники также будет легко оценить и понять, какие контроли соответствующим образом используются при применении эти способов. Концентрации компонентов реакции, буферы, температуры и период времени,

подходящие для обеспечения взаимодействия компонентов реакции, можно определить и/или регулировать в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, и которые хорошо известны специалистам в данной области техники.

Способы применения и композиции

[00239] Как только антиген идентифицирован и выбран в качестве иммуногена для индуцирования иммунного ответа, идентифицируется и выбирается полинуклеотидная последовательность, которая кодирует желаемый иммуноген. Рекомбинантный экспрессионный вектор, включающий полинуклеотидную последовательность или векторная частица, содержащая вектор, затем вводят в иммуногенную композицию по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом или носителем. Как описано в настоящем документе, адъювант компонуется по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом или носителем. Как иммуногенная композиция, так и адъювантная композиция скомпонованы соответствующим образом для иммуногена и адъюванта, соответственно, и для пути (или режима) введения.

[00240] Как описано в настоящем документе, по меньшей мере один иммуноген или иммуногенную композицию вводят субъекту, имеющему для этого показания, в количестве, достаточном, чтобы вызвать эффективный иммунный ответ, который может быть эффективным гуморальным ответом и/или эффективным клеточно-опосредованным иммунным ответом (который может включать цитотоксический Т-клеточный ответ). Не желая быть связанными теорией, как описано в настоящем документе, вводимый субъекту адъювант или адъювантная композиция индуцирует экспрессию цитокинов (например, Cxcl9, Cxcl10, CCL2, CCL3, MCP-1, TNFa, IFNc и IP-10), которые вовлекают CD8 Т-клетки (например, в место введения, такое как область опухоли или мочевого пузыря) и/или усиливают или повышают иммунный ответ по меньшей мере на один иммуноген.

[00241] Иммуногенные композиции, адъювантые композиции, рекомбинантные экспрессионные векторы и векторные частицы могут быть пригодны для применения в способах предотвращения (т.е. для

снижения вероятности возникновения или рецидива) и/или лечения заболевания или нарушения, например, рака, особенно, вирус-индуцированных раковых заболеваний. Иммуноген представляет собой антиген онкогенного вируса или опухолеассоциированный антиген, который прогнозируемо или доказано экспрессируется одной или более определенными раковыми клетками.

[00242] В настоящем изобретении предлагаются способы предотвращения, облегчения или лечения рака путем применения схемы "прайм-пулл", описанной в настоящем документе, при этом способ включает введение первой "прайм"-композиции, содержащей рекомбинантный экспрессионный вектор, экспрессирующий иммуноген (например, один или более антигенов, ассоциированных с раком), с последующим введением "пулл"-композиции, содержащей агонист TLR4, такой как GLA, в отсутствие антигена (но необязательно - с одним или более опухолеассоциированных антигенов), вводимой местно в область рака или опухоли (например, внутриопухолево, перитуморально, интранодально, через слизистую оболочку, внутрипузырно).

[00243] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предлагаются способы, которые пригодны для предотвращения, облегчения или лечения рака, при этом рак содержит одну или более опухолей, которые доступны для непосредственной инъекции "пулл"-композиции, содержащей агонист TLR4, либо внутрь, либо вокруг опухоли, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах реализации изобретения солидная опухоль представляет собой карциному, саркому или лимфому. В связи с этим, поскольку лимфомы обычно расцениваются как "жидкие" опухоли, доступные солидные ("твердые") опухоли могут образовываться в лимфатических узлах и, таким образом, могут быть пролечены с использованием схем "прайм-пулл", описанных в настоящем документе.

[00244] В настоящем изобретении предлагаются способы предотвращения, облегчения или лечения вирус-индуцированного рака путем применения схемы "прайм-пулл", описанной в настоящем

документе, при этом способ включает введение первой "прайм"-композиции, содержащей рекомбинантный экспрессионный вектор, экспрессирующий иммуноген (например, один или более вирусных антигенов, при этом вирус представляет собой вирус, ассоциированный с раком), с последующим введением "пулл"-композиции, содержащей агонист TLR4, такой как GLA, необязательно с одним или более вирусных антигенов и/или одним или более опухолеассоциированных антигенов), вводимой местно в область рака или опухоли (например, внутриопухолево, через слизистую оболочку, внутрипузырно). Типичные вирус-индуцированные раковые заболевания, которые можно лечить или облегчить с помощью способов, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, рак мочевого пузыря, карциному из клеток Меркеля, саркому Капоши, рак печени, глиобластому, лимфому Беркитта, неходжкинскую лимфому, посттрансплантационный лимфопролиферативный синдром, рак носоглотки, рак шейки матки, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярную карциному и Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых.

[00245] В некоторых вариантах реализации изобретения схемы "прайм-пулл", описанные в настоящем документе, применяют в сочетании с одним или более другими терапевтическими агентами. Так, в некоторых вариантах реализации изобретения также предлагается введение композиций, содержащих GLA, согласно данному описанию, в комбинации с одним или более другими терапевтическими агентами (например, другими противораковыми агентами или другими видами паллиативной или адъювантной терапии). В некоторых вариантах реализации изобретения такие терапевтические агенты могут быть приняты в этой области техники в качестве стандартного лечения определенного рака, как описано в настоящем документе. Типичные предполагаемые терапевтические агенты включают цитокины, факторы роста, стероиды, НПВС, DMARD, противовоспалительные средства, ингибиторы иммунных контрольных точек, химиотерапевтические, радиотерапевтические или другие активные и вспомогательные агенты.

[00246] В некоторых вариантах реализации изобретения способы, описанные в настоящем документе, применяются в

сочетании с одним или более противораковыми терапевтическими агентами, включая один или более химиотерапевтических агентов. Примеры противораковых терапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (ЦИТОКСАН™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилолмеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустином, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамина оксид гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; препараты нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азазерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицина, карзинофилин, хромомицины дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идаруцибин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидеоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, дромостанолона пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоглютетимид, митотан, трилостан; компенсатор фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; алдофосфамида гликозид; аминолевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформитин; эллипиния ацетат; этоглюцид;

нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманиум; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2, 2', 2"-трихлоротриетиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел (ТАКСОЛ®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси) и доксетаксел (ТАКСОТЕР®, Rhne-Poulenc Rorer, Антони, Франция); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; трастузумаб, доцетаксел,платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифлуюромемиломитин (DMFO); производные ретиноевой кислоты, такие как Таргретин™ (бексаротен), Панретин™ (алитретиноин); ОНТАК™ (денилейкин дифтитокс); эсперамицины; капецитабин; и их фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из перечисленных выше веществ. Также в это определение включены антигормональные агенты, которые действуют с целью регуляции или ингибирования гормонального влияния на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Фарестон); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из перечисленных веществ. Дополнительные противораковые терапевтические агенты включают сорафениб и другие ингибиторы протеинкиназы, такие как афатиниб, акситиниб, бевацизумаб, цетуксимаб, кризотиниб, дазатиниб, эрлотиниб, фостаматиниб, гефитиниб, иматиниб, лапатиниб, лневатиниб, мубритиниб, нилотиниб, панитумумаб, пазопаниб, пегаптаниб, ранибизумаб, руксолитиниб, трастузумаб, вандетаниб,

вемурафениб и сунитиниб; сиролимус (рапамицин), эверолимус и другие ингибиторы mTOR.

[00247] В другом варианте реализации изобретения способы, описанные в настоящем документе, применяются в комбинации с другим иммуностимулирующим агентом. Такие иммуностимулирующие агенты включают, но не ограничиваются ими, N-ацетилмурамил-L-аланин-D-изоглутамин (MDP), глюкан, IL-12, GM-CSF, интерферон-γ и антитела анти-CD40 или другие антитела, которые связываются и активируют костимулирующие пути (например, CD28, ICOS, OX40, CD27 и тому подобное).

[00248] В одном варианте реализации изобретения способы, описанные в настоящем документе, применяются в комбинации с одним или более ингибиторами иммунных контрольных точек. Иммунные контрольные точки относятся к различным ингибирующих путям иммунной системы, которые ответственны за поддержание аутотолерантности и модуляции длительности и амплитуды иммунных реакций. Опухоли используют определенные пути иммунных контрольных точек в качестве основного механизма иммунного сопротивления, особенно в отношении Т-клеток, которые являются специфическими для опухолевых антигенов. (см., например, Pardoll, 2012 Nature 12:252; Chen and Mellman 2013 Immunity 39:1). В настоящем изобретении предлагаются ингибиторы иммунных контрольных точек, которые могут вводиться в комбинации с композицией GLA без антигена. Такие комбинированные виды терапии действуют согласовано для усиления иммунного ответа против рака. Некоторые вирусы также разработали механизмы кооптации путей иммунных контрольных точек. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения такая комбинированная терапия может быть использована для усиления противовирусного иммунного ответа.

[00249] Ингибиторы иммунных контрольных точек включают любой агент, который блокирует или ингибирует статистически, клинически и биологически значимым образом ингибирующие пути иммунной системы. Такие ингибиторы могут включать низкомолекулярные ингибиторы или могут включать антитела или их антиген-связывающие фрагменты, которые связываются и блокировать

или ингибировать рецепторы иммунных контрольных точек, или антитела, которые связываются и блокируют или ингибируют лиганды рецепторов иммунных контрольных точек. Иллюстративные молекулы иммунных контрольных точек, которые могут быть нацелены на блокирование или ингибирование, включают, но не ограничиваются ими, CTLA-4, 4-1BB (CD137), 4-1BBL (CD137L), PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4 (принадлежит к семейству молекул CD2 и экспрессируется на всех NK, $\gamma\delta$ и T-клетках памяти $CD8^+$ ($\alpha\beta$)), CD160 (также называемый BY55) и CGEN-15049. Ингибиторы иммунных контрольных точек включают антитела или их антиген-связывающие фрагменты, или другие связывающие белки, которые связываются и блокируют или ингибируют активность одного или более из элементов: CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4, CD160 и CGEN-15049. Иллюстративные ингибиторы иммунной контрольной точки включают тремелимумаб (блокирующее антитело CTLA-4), анти-OX40, моноклональное антитело PD-L1 (анти-B7-H1; MEDI4736), MK-3475 (блокатор PD-1), ниволумаб (антитело анти-PD1), CT-011 (антитело анти-PD1), моноклональное антитело BY55, AMP224 (антитело анти-PDL1), BMS-936559 (антитело анти-PDL1), MPLDL3280A (антитело анти-PDL1), MSB0010718C (антитело анти-PDL1) и Yervoy/ипилимумаб (ингибитор контрольной точки анти-CTLA-4).

[00250] В дополнительном варианте реализации изобретения способы с применением схемы "прайм-пулл", описанной в настоящем документе, используются в сочетании с другими агонистами TLR4 или агонистом TLR8, или агонистом TLR9. Такой агонист может быть выбран из пептидогликана, полиI:C, CpG, 3M003, флагеллина, гомолога эукариотического рибосомального удлинения *Leishmania* и фактора инициации 4a (LeIF).

[00251] В дополнительном варианте реализации изобретения схемы "прайм-пулл", описанные в настоящем документе, применяют в сочетании с одним или более цитокинами. Под термином "цитокин" понимают общий термин для белков, высвобождаемых одной популяцией клеток, которые действуют на другую клетку как

межклеточные медиаторы. Примеры таких цитокинов включают лимфокины, монокины и традиционные полипептидные гормоны. В число цитокинов входят гормоны роста, такие как человеческий гормон роста, N-метионильный человеческий гормон роста и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (FSH), тиреотропный гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); печеночный фактор роста; фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор некроза опухоли-альфа и -бета; муллериан-ингибирующее вещество; мышиный гонадотропин-ассоциированный пептид; ингибин; активин; сосудистый эндотелиальный фактор роста; интегрин; тромбопоэтин (TPO); факторы роста нервов, такие как NGF-бета; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF-альфа и TGF-бета; инсулиноподобный фактор роста-I и -II; эритропоэтин (EPO); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон-альфа, бета и -гамма; колониестимулирующие факторы (CSF), такие как макрофагальный CSF (M-CSF); гранулоцитарно-макрофагальный CSF (GM-CSF); и гранулоцитарный CSF (G-CSF); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1 альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, фактор некроза опухоли, такой как TNF-альфа или TNF-бета; и другие полипептидные факторы, включая LIF и набор-лиганд (KL). В данном контексте термин "цитокин" включает белки, полученные из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток, и биологически активные эквиваленты цитокинов с нативными последовательностями.

[00252] В некоторых вариантах реализации изобретения способы с применением схемы "прайм-пулл", описанной в настоящем документе, используются в сочетании с хлорохином, лизосомотропным агентом, который предотвращает эндосомальное подкисление и ингибирует аутофагию, индуцированную опухолевыми клетками с целью сохранения ускоренного роста клеток и недостатка питательных веществ. В более общем смысле композиции, включающие GLA, как описано в настоящем документе, могут быть введены в комбинации с терапевтическими агентами, которые

действуют как ингибиторы аутофагии, радиосенсибилизаторами или химиосенсибилизаторами, такими как хлорохин, мизонидазол, метронидазол и гипоксические цитотоксины, такие как тирапазамин. В связи с этим, такие комбинации GLA с хлорохином или другим радио- или химиосенсибилизаторами или ингибиторами аутофагии, могут быть использованы в дополнительных комбинациях с другими противораковыми терапевтическими агентами или лучевой терапией.

[00253] В другом варианте реализации изобретения способы с применением схемы "прайм-пулл", описанной в настоящем документе, используются в сочетании с низкомолекулярными препаратами, которые, как известно, приводят к гибели опухолевых клеток с сопутствующей активацией иммунных ответов, называемой "иммуногенная гибель клеток", такие как циклофосфамид, доксорубицин, оксалиплатин и митоксантрон. Кроме того, комбинации с препаратами, которые известны повышением иммуногенности опухолевых клеток, такими как патупион (эпотилон B), моноклональное антитело 7A7.27, нацеленное на рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), ингибиторы гистондеацетилазы (например, вориностат, ромидепсин, панобиностат, белиностат и энтиностат), н3-полиненасыщенная жирная кислота докозагексаеновая кислота, кроме того, протеасомные ингибиторы (например, бортезомиб), шиконин (основная составляющая корня Lithospermum erythrorhizon) и онколитические вирусы, такие как TVec (talimogene laherparepvec). В других вариантах реализации изобретения композиции, включающие GLA, описанные в настоящем документе, могут быть введены в комбинации с эпигенетическими препаратами, такими как ингибиторы ДНК-метилтрансферазы (например, децитабин, 5-аза-2'-дезоксицитидин), который может вводиться местно или системно.

[00254] В другом варианте реализации изобретения способы с применением схемы "прайм-пулл", описанной в настоящем документе, используются в сочетании с одним или более антителами, которые увеличивают ADCC-поглощение опухоли дендритными клетками (DC). Таким образом, в настоящем изобретении предлагаются комбинированные композиции, содержащие GLA с любой молекулой,

которая индуцирует или усиливает поглощение опухолевой клетки или ее фрагментов антиген-представляющими клетками с последующим представлением опухолевых антигенов иммунной системе. Эти молекулы включают агенты, которые индуцируют связывание рецепторов (таких как Fc или рецепторов маннозы) и транспортировку в антиген-представляющие клетки, такие как антитела, антитело-подобные молекулы, мультиспецифические поливалентные молекулы и полимеры. Такие молекулы могут быть введены либо внутриопухолево в композиции, содержащей GLA, либо введены с помощью другого пути. Например, композиция, содержащая GLA, как описано в настоящем документе, может быть введена внутриопухолево в сочетании с внутриопухолевой инъекцией ритуксимаба, цетуксимаба, трастузумаба, кэмпаса, панитумумаба, офатумумаба, брентуксимаба, пертузумаб, адо-трастузумаба эмтансина, обинутузумаба, антител анти-HER1, -HER2 или -HER3 (например, MEHD7945A; MM-111; MM-151; MM-121; AMG888), антител анти-EGFR (например, нимотузумаба, ABT-806) или других подобных антител. Любая поливалентная каркасная структура, которая может взаимодействовать с рецепторами Fc и другими рецепторами, имеющими возможность индуцировать интернализацию, может быть использована в комбинированных видах терапии, описанных в данном документе, например, пептиды и/или белки, способные связывать мишени, которые соединены с Fc-фрагментами или полимерами, способными взаимодействовать с рецепторами.

[00255] В некоторых вариантах реализации изобретения способы с применением схемы "прайм-пулл", описанной в настоящем документе, используются в сочетании с другим антителом, которое активирует костимулирующий сигнал (например, путем блокирования ингибирующих путей), таким как анти-CTLA-4, или антителами, которые активируют костимулирующие пути, такими как антитела анти-CD40, анти-CD28, анти-ICOS, анти-OX40, анти-CD27 и тому подобное.

[00256] Способы с применением схемы "прайм-пулл", описанной в настоящем документе, могут использоваться в комбинации с другими известными методами лечения рака, такими как лучевая терапия, ингибиторы иммунных контрольных точек, химиотерапия или

другие терапевтические противораковые агенты, трансплантация, иммунотерапия, гормональная терапия, фотодинамическая терапия и т.д. Композиции могут также вводиться в комбинации с антибиотиками.

[00257] Как будет понятно специалисту в области медицины, термины "лечить" и "лечение" относятся к медицинской лечебной тактике относительно заболевания, нарушения или патологического состояния у субъекта (т.е. пациента) (см., например, Stedman's Medical Dictionary). В целом, соответствующая доза и схема лечения обеспечивают иммуноген и адъювант в количестве, достаточном для достижения терапевтической и/или профилактической эффективности. Терапевтическая и/или профилактическая эффективность включает, например, улучшение клинического исхода, как в результате терапевтического лечения, так и профилактических или превентивных мер, при этом цель состоит в предотвращении или замедлении, или торможении (уменьшении) нежелательного физиологического изменения или нарушения, или в предотвращении или замедлении, или торможении (уменьшении) развития или тяжести такого заболевания или нарушения. Благоприятные или желаемые клинические результаты лечения субъекта, включают, но не ограничиваются ими, ослабление, уменьшение или облегчение симптомов, которые являются результатом заболевания или нарушения, подлежащего лечению, или связанные с ним; снижение частоты проявления симптомов; улучшение качества жизни; более продолжительный статус без признаков заболевания (т.е. уменьшение вероятности или склонности субъекта к развитию симптомов на основании которых поставлен диагноз заболевания); снижение степени тяжести заболевания; стабилизированное (т.е. не прогрессирующее) течение заболевания; задержку или замедление прогрессирования заболевания; улучшение или временное облегчение течения заболевания; и ремиссию (частичную или полную), либо определяемую, либо не определяемую; и/или общую выживаемость. Термин "лечение" может также означать повышение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью субъекта, который не

получает лечения. Субъекты, имеющие показания к лечению, включают тех, кто уже имеют заболевание или нарушение, а также субъекты, которые привержены к наличию или риску развития заболевания или нарушения. Субъекты, имеющие показания к профилактическому лечению, включают субъектов, у которых заболевание, патологическое состояние или нарушение должно быть предотвращено (т.е. уменьшена вероятность возникновения или рецидива заболевания или нарушения).

[00258] Рекомбинантные экспрессионные векторы и векторные частицы могут быть введены субъекту в фармацевтически или их физиологически приемлемом вспомогательном веществе или носителе. Фармацевтически приемлемые вспомогательнiе вещества представляют собой биологически совместимые несущие среды, например, физиологический солевой раствор, которые описаны более подробно в настоящем документе и пригодны для введения человеку или другому нечеловекоподобному субъекту, включая нечеловекоподобного млекопитающего субъекта. Терапевтически эффективное количество представляет собой количество полинуклеотида, которое способно производить клинически желаемый результат (т.е. достаточное количество иммуногена для индуцирования или усиления иммунного ответа, специфического для иммуногена (гуморальный и/или клеточно-опсредованный ответ, включая цитотоксический Т-клеточный ответ) статистически, биологически и/или репрезентативно значимым образом) в получающем лечение организме человека или нечеловекоподобного животного. Как хорошо известно в области медицины, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, включая антропометрические данные пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное соединение для введения, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья, а также другие препараты, которые вводятся одновременно. Дозы будут варьироваться, но предпочтительная доза для введения векторной частицы, содержащей рекомбинантный экспрессионный вектор является достаточной для обеспечения от около 10^6 до 10^{12} копий молекулы полинуклеотидного вектора.

[00259] Фармацевтические композиции, включая иммуногенные и

адъювантные композиции, описанные в настоящем документе, могут быть введены способом, подходящим для заболевания, подлежащего лечению (или предотвращению), как определено специалистами в области медицины. Соответствующая доза и подходящая продолжительность и частота введения будет определяться такими факторами, как состояние пациента, тип и тяжесть заболевания пациента, конкретная форма активного ингредиента и способ введения. В целом, соответствующая доза и схема лечения обеспечивают композицию (композиции) в количестве, достаточном для достижения терапевтической и/или профилактической эффективности (так, как описано в настоящем документе, включая улучшение клинического исхода, такого как более частая полная или частичная ремиссия или более длительная выживаемость без признаков заболевания и/или общая выживаемость или уменьшение тяжести симптомов). Для профилактического применения доза должна быть достаточной, чтобы предотвратить, задержать начало или уменьшить тяжесть заболевания, ассоциированного с заболеванием или нарушением.

[00260] В общем, количество иммуногена, включая слитые полипептиды, как описано в настоящем описании, содержится в дозе, или пропродуцируется in situ с помощью кодирующего полинуклеотида, содержегося в дозе в диапазоне от около 0,01 мкг до около 1000 мкг на кг веса хозяина. Использование минимальной дозировки, которая является достаточной для обеспечения эффективной терапии, как правило, предпочтительнее. Как правило, терапевтическую или профилактическую эффективность у пациентов можно контролировать с использованием анализов, подходящих для патологического состояния, которое подлежит лечению или профилактике, и известных обычным специалистам в данной области техники и описанных в настоящем документе. При введении в жидкой форме подходящие количества дозы будут изменяться в зависимости от веса пациента, но обычно находятся в пределах от около 1 мл до около 500 мл (что составляет от около 0,01 мкг до около 1000 мкг на кг) для субъекта весом 10-60 кг. Оптимальные дозы обычно могут быть определены с использованием экспериментальных моделей и/или клинических исследований. Оптимальная доза может зависеть

от массы тела, веса или объема крови субъекта. Как описано в настоящем документе, соответствующая доза может также зависеть от состояния пациента (например, человека), то есть стадии заболевания, общего состояния здоровья, а также от возраста, пола и веса, а также других факторов, известных специалисту в области медицины.

[00261] Фармацевтические композиции могут быть приготовлены для соответствующего способа введения, включая, например, местный, пероральный, энтеральный, назальный (т.е. интраназальный), ингаляционный, интратекальный, ректальный, вагинальный, внутриглазной, субконъюнктивальный, сублингвальный, внутрикожный, интранодальный, внутриопухолевый, трансдермальный пути или парентеральное введение, включая подкожную, чрезкожную, внутривенную, внутримышечную, внутригрудинную, интракавернозную, внутриканальную или интрауретральную инъекцию или инфузию. Способы введения описаны в настоящем документе более подробно.

[00262] Для парентерального введения носитель предпочтительно содержит воду, солевой раствор, спирт, жир, воск или буфер. Для перорального введения может использоваться любое из указанных выше вспомогательных веществ или твердых наполнителей или носителей, таких как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, тальк, целлюлоза, каолин, глицерин, крахмальные декстрины, альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза, глюкоза, сахароза и/или карбонат магния.

[00263] Иммуногенная композиция и композиция, содержащая конструкцию рекомбинантного вектора или векторную частицу, могут быть приготовлены для доставки любым способом, который обеспечивает эффективную дозу иммуногена. Такие способы введения включают пероральное введение или доставку композиции путем инъекции, которая может быть в форме жидкости. Жидкая фармацевтическая композиция может включать, например, одно или более из следующих веществ: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический солевой раствор, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, нелетучие масла, которые могут служить в

качестве растворителя или суспендирующей среды, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные средства; антиоксиданты; хелатообразующее средства; буферы и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Препарат для парентерального введения может быть разлит в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы, содержащие несколько доз и изготовленные из стекла или пластика. Использование физиологического солевого раствора является предпочтительным, и инъекционная фармацевтическая композиция предпочтительно является стерильной.

[00264] Для фармацевтических композиций, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, такую как рекомбинантные экспрессионные векторы, описанные в настоящем документе, молекула нуклеиновой кислоты может присутствовать в любой из множества систем доставки, известных специалистам в этой области техники, включая экспрессионные системы нуклеиновых кислот, бактериальные, вирусные экспрессионные системы и экспрессионные системы млекопитающих, такие как, например, векторные частицы и рекомбинантные экспрессионные конструкции, описанные в настоящем документе. Методики включения полинуклеотидов (например, ДНК) в такие экспрессионные системы хорошо известны обычным специалистам в данной области техники. В других конкретных вариантах реализации изобретения ДНК может также быть "оголенной", как описано, например, в Ulmer et al., Science 259:1745-49, 1993 и проанализировано Cohen, Science 259:1691-1692, 1993. Поглощение оголенной ДНК может быть повышено путем нанесения ДНК на биоразлагаемые гранулы, которые эффективно транспортируются в клетки.

[00265] Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть доставлены в клетку согласно любому из нескольких способов, описанных в данной области техники (см., например, Akhtar et al., Trends Cell Bio. 2:139 (1992); Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995, Maurer et al., Mol. Membr. Biol. 16:129-40 (1999); Hofland и Huang, Handb. Exp. Pharmacol. 137:165-92 (1999); Lee et al., ACS Symp. Ser. 752:184-92 (2000); патент США № 6395713; публикация

международной патентной заявки № WO 94/02595); Selbo et al., Int. J. Cancer 87:853-59 (2000); Selbo et al., Tumour Biol. 23:103-12 (2002); публикация патентной заявки США №№ 2001/0007666 и 2003/077829). Такие способы доставки, известные специалистам с навыками в данной области техники, включают, но не ограничиваются ими, инкапсулирование в липосомах, ионофорез, или включение в другие несущие среды, такие как биоразлагаемые полимеры; гидрогели; циклодекстрины (см., например, Gonzalez et al., Bioconjug. Chem. 10:1068-74 (1999); Wang et al., Публикация международной патентной заявки №№ WO 03/47518 и WO 03/46185); микросферы с поликислотой (молочная с гликолевой) (PLGA) и PLCA (также пригодны для доставки пептидов и полипептидов, и других веществ) (см., например, патент США № 6447796; публикацию патентной заявки США № 2002/130430); биоразлагаемые нанокапсулы; и биоадгезивные микросферы, или белковые векторы (публикация международной патентной заявки № WO 00/53722). В другом варианте реализации изобретения молекулы нуклеиновых кислот могут быть также составлены или объединены в комплекс с полиэтиленимином и его производными, такими как производные полиэтиленимин-полиэтиленгликоль-N-ацетилгалактозамина (PEI-PEG-GAL) или полиэтиленимин-полиэтиленгликоль-три-N-ацетилгалактозамина (PEI-PEG-triGAL) (см. также, например, публикацию патентной заявки США № 2003/0077829).

[00266] В конкретных вариантах реализации изобретения, описанных в настоящем документе, субъектом является человек или нечеловекоподобное животное. Субъект, нуждающийся в лечении, описанном в настоящем документе, может иметь симптомы или осложнения заболевания, нарушения или патологического состояния, описанного в настоящем документе или может быть подвержены риску развития заболевания, нарушения или патологического состояния. Нечеловекоподобные животные, которые могут получать лечение, включают млекопитающих, например, нечеловекоподобных приматов (например, обезьяна, шимпанзе, горилла и тому подобное), грызунов (например, крысы, мыши, песчанки, хомяки, хорьки, кролики), зайцеобразных, свиней (например, свинья, миниатюрная свинья), животных, относящихся к семейству лошадиных, собачьих,

кошачьих, жвачных и других домашних, сельскохозяйственных животных и животных зоопарка.

[00267] Композиции, предлагаемые в настоящей заявке, могут быть в различных формах, например, в твердой, жидкой, порошкообразной, водной или лиофилизированной форме. Примеры пригодных фармацевтических вспомогательных веществ и носителей для введения векторной частицы, включая частицу вирусного вектора и частицу бактериального вектора, иммуногенные композиции, а также рекомбинантные экспрессионные векторы известны в данной области техники. Такие вспомогательные вещества, носители и/или добавки могут быть приготовлены обычными способами и могут вводиться субъекту в соответствующей дозе. Стабилизирующие агенты, такие как липиды, ингибиторы нуклеазы, полимеры и хелатирующие агенты, которые могут быть включены в композиции, описанные в настоящем документе, могут способствовать предотвращению расщепления композиций и компонентов композиций в организме.

[00268] Векторные частицы, включая частицу вирусного вектора и частицу бактериального вектора, иммуногенные композиции, адъювантные композиции, а также рекомбинантные экспрессионные векторы, описанные в настоящем документе, могут быть упакованы в виде наборов. Наборы необязательно могут включать один или более компонентов, таких как инструкции по применению, устройства и дополнительные реагенты, а также компоненты, такие как пробирки, контейнеры, например флаконы и шприцы для практической реализации способов. Типичные наборы необязательно могут включать инструкции по применению, устройство или реагенты для обнаружения векторной частицы, рекомбинантного экспрессионного вектора или иммуногена у субъекта, а также устройство для введения композиции или композиций субъекту.

[00269] Наборы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие иммуноген, также рассматриваются в данном описании. Такой набор может также включать по меньшей мере одну плазмиду, кодирующую компоненты упаковки вируса, и вектор, кодирующий вариант гликопротеина вируса Синдбис E2. Некоторые наборы будут

содержать по меньшей мере одну плазмиду, кодирующую компоненты упаковки вируса, и вектор, кодирующий вариант гликопротеина вируса Синдбис E2, и вектор, кодирующий по меньшей мере один фактор созревания DC.

[00270] Наборы, содержащие вирусный вектор, кодирующий последовательность, представляющую интерес (как правило, кодирующую антиген или иммуноген), и необязательно полинуклеотидную последовательность, кодирующую фактор созревания DC, также рассматриваются в данном описании. В некоторых наборах набор включает по меньшей мере одну плазмиду, кодирующую компоненты упаковки вируса и вектор, кодирующий вариант гликопротеина вируса Синдбис E2.

[00271] Набор может также содержать инструкции по применению. Инструкции, как правило, описывают способы введения, включая способы определения текущего состояния субъекта, надлежащего количества дозы и правильного способа введения при введении композиции. Инструкции также могут включать руководство для мониторинга за состоянием субъекта в течение процесса лечения.

[00272] Наборы, предлагаемые в настоящем изобретении, могут также включать устройство для введения субъекту иммуногенной композиции, содержащей векторную частицу, которая включает рекомбинантный экспрессионный вектор, и/или адъювантной композиции. Любое из множества устройств, известных в данной области техники, для введения медицинских препаратов или вакцин, может быть включено в наборы, предлагаемые в настоящем изобретении. Типичные устройства включают, но не ограничиваются ими, иглу для подкожных инъекций, иглу для внутривенных инъекций, катетер, безыгольный инъектор, ингалятор, а также дозатор жидкости, такой как пипетка. Как правило, устройство для введения композиции является совместимым с активными компонентами набора. Например, безыгольный инъектор, такой как безыгольный инъектор под высоким давлением, может быть включен в наборы вместе с векторными частицами, полинуклеотидами и полипептидами, которые не повреждаются при инъекционном введении под высоким давлением, но, как правило, не включается в набор,

содержащий векторные частицы, полинуклеотиды и полипептиды, которые могут повреждаться при инъекционном введении под высоким давлением.

[00273] Другие варианты реализации и применения изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники с учетом настоящего описания. Следующие примеры приведены лишь в качестве иллюстрации различных вариантов реализации изобретения и не должны толковаться как ограничивающие настоящее изобретение каким-либо образом.

ПРИМЕРЫ

[00274] Пример 1. Вовлечение CD8 Т-клеток в мочевой пузырь.

[00275] Исследования проведены на мышах с целью демонстрации того, что CD8 Т-клетки, полученные путем подкожной иммунизации, могут быть вовлечены в мочевой пузырь. Группы мышей линии BALB/C (включая соответствующие контрольные группы; 5 мышей на группу) иммунизировали введением различных доз (10E8, 10E9, 10E10) рекомбинантного лентивектора в хвостовое основание, как описано в настоящем документе, в три момента времени (например, 0, 2, 4 недели). Через неделю после последней иммунизации мышам вводили либо еженедельно БЦЖ (штамм TICE) в дозе 1 мг/мл, с 5-8×10E7 КОЕ/мг за 6 инстилляций в соответствии с установленными процедурами, либо два раза в неделю - 5 мкг GLA в виде 2% стабильной эмульсии. Через одну неделю после последней инстилляции БЦЖ/GLA мышей умерщвляли и удаляли их мочевые пузыри. Из каждого мочевого пузыря получали гистологические срезы, фиксировали их и окрашивали соответствующими антителами для детекции и типирования иммунных клеток, таких как клетки NK, дендритные клетки, Т-клетки, В-клетки и т.д. согласно установленным протоколам. Кроме того, часть каждой клетки мочевого пузыря подвергали расщеплению коллагеназой, Т-клетки изолировали с использованием магнитных гранул, окрашенных пентамерами для NY-ESO-1 эпитоп-специфических CD8 Т-клеток, и анализировали в потоке согласно установленным протоколам.

[00276] Для определения иммунологической и клинической эффективности лечения использовали известную мышиную модель

ортотопического рака мочевого пузыря на основе линии опухолевых клеток мыши MB-49 (Durek 2002; и Kang, M. R., et al., J. Vis. Exp. (65), e4207, (2012)). Используя интегрирующий рекомбинантный лентивектор, как описано в настоящем документе, кодирующий NY-ESO-1, генерировали и тестировали рекомбинантные клоны MB-49, экспрессирующие NY-ESO-1, на предмет кинетики роста опухоли после имплантации мочевого пузыря. Мышам с известными опухолями проводили лечение, описанное в (1), и осуществляли мониторинг клинической противоопухолевой эффективности с помощью соответствующих способов in vivo (например, ультразвуковая визуализация), морфометрические измерения после умерщвления мышей в заранее установленные моменты времени и анализ проникающих в опухоль лимфоцитов (Watkins, S. K., et al., J. Vis. Exp. (64), e3952, (2012)).

[00277] Пример 2. "Прайм"- введение лентивирусного вектора после внутриопухолевого введения GLA эффективно "подтягивает" антиген-специфические CD8 Т-клетки к опухоли.

[00278] Этот пример демонстрирует, что внутриопухолевое введение GLA после иммунизации векторной вакциной "подтягивает" вектор-индуцированные антиген-специфические CD8 Т-клетки к опухоли.

[00279] В этом исследовании на день 0 мышам линии C57BL/6 (5 мышей на группу) подкожно, в подушечку лапы, прививали клетки B16F10-OVA в количестве 1 X 10^6. На день 10 мышей иммунизировали геномами VP02/OVA (или контрольным вектором VP02/GFP) в количестве 2 X 10^{10} путем введения в основание хвоста. На день 21 мышам внутриопухолево вводили 5,0 мкг GLA/2% SE. Опухоли собирали и анализировали на предмет проникающих в опухоль лимфоцитов с помощью проточной цитометрии непосредственно перед (D+0), через один день после (D+1) или через два дня после (D+2) введения GLA.

[00280] Как и ожидалось, несколько OVA-специфических CD8 Т-клеток были обнаружены в опухолях мышей, иммунизированных контрольным вектором VP02/GFP (Фиг. 1A, верхние панели). На день 0 в опухолях мышей, иммунизированных VP02/OVA, было обнаружено в среднем 1,9% OVA-специфических CD8 Т-клеток, что

свидетельствовало о том, что некоторые CD8-позитивные антиген-специфические клетки, праймированные вектором, проникали в опухоль. На день 1 и 2 после введения GLA, в опухолях мышей, иммунизированных VP02/OVA, было обнаружено в среднем 2,7% и 3,4% OVA-специфических CD8 Т-клеток, соответственно, по сравнению с 1,9% до введения GLA (Фиг. 1B), что свидетельствовало о том, что внутриопухолевое введение GLA привело к "подтягиванию" CD8 антиген-специфических Т-клеток в опухоль. В течение 48 часов после введения GLA отмечалось в среднем 7-кратное увеличение в процентах Ag-специфических CD8 Т-клеток в опухолях, на которые воздействовали лечением, по сравнению с интактными опухолями (n=5). Процентное отношение OVA-специфических CD8 Т-клеток, обнаруженных в опухолях мышей, иммунизированных вектором, по сравнению с неиммунизированными мышами увеличилось в 1,8 раза на день 1 и 2 после введения GLA.

[00281] Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что как только антиген-специфические CD8 Т-клетки начинают системно генерироваться ("прайм"), местное введение адъюванта в место опухоли "подтягивает" эти CD8 Т-клетки в опухоль, опосредуя защитный иммунитет. Эти данные дают основание для использования принципа "прайм-пулл" в качестве перспективной вакцинальной стратегии для иммунотерапии рака.

[00282] Пример 3. Оценка терапевтической эффективности стратегии "прайм-пулл".

[00283] Этот пример демонстрирует, что внутриопухолевое введение GLA после иммунизации векторной вакциной "подтягивает" вектор-индуцированные антиген-специфические CD8 Т-клетки к опухоли и дополнительно демонстрирует терапевтическую эффективность стратегии "прайм-пулл".

[00284] В этом исследовании на день 0 самкам мышей линии C57BL/6 или BALB/c (5 мышей на группу) подкожно, во фланк, прививали клетки B16F10-OVA или клетки CT26, соответственно, в количестве 1 X 10^5. На день 7 мышей иммунизировали геномами VP02/OVA (C57BL/6) или VP02/AH1A5 (BALB/C) (или контрольным вектором VP02/GFP) в количестве 2 X 10^{10} путем введения в основание хвоста. Начиная со дня 7 или 14 мышам внутриопухолево

вводили 5,0 мкг GLA/2% SE каждые 3-4 дня. На день 18 (через один день после последнего введения GLA/SE) опухоли B16F10-OVA собирали и анализировали на предмет проникающих в опухоль лимфоцитов с помощью проточной цитометрии.

[00285] У мышей, иммунизированных контрольным вектором (VP02/GFP), обнаружено 1,8% проникающих в опухоль лимфоцитов (Фиг. 2A). GLA/SE, применяемый в качестве монотерапии, не вызывал увеличения процента инфильтрации лимфоцитами. VP02/OVA, применяемый в качестве монотерапии, вызывал увеличение % инфильтрации лимфоцитами до 3,2%, в то время как VP02/OVA+GLA/SE дополнительно увеличивал % инфильтрации лимфоцитами до 7,5%, что в общей сложности в 4 раза выше исходного уровня инфильтрации опухоли лимфоцитами. Из лимфоцитов, обнаруженных в опухоли, VP02/OVA, применяемый в качестве монотерапии, генерировал 16,6% OVA-специфических CD8 Т-клеток по сравнению с 0,9% у контрольных мышей, в то время как GLA/SE, применяемый в качестве монотерапии, генерировал 14,7% регуляторных Т-клеток по сравнению с 9,7% у контрольных мышей. Эти данные свидетельствуют о том, что антиген-специфические CD8 Т-клетки, сгенерированные вектором, направляются в опухоль, а также что в случае отсутствия антиген-специфического "прайм"-введения, GLA/SE "подтягивает" к месту опухоли в основном регуляторные Т-клетки. При наличии антиген-специфического "прайм"-введения, несмотря на то, что GLA/SE продолжает "подтягивать" регуляторные Т-клетки в опухоль, он также "подтягивает" в опухоль больше антиген-специфических CD8 Т-клеток (Фиг. 2B).

[00286] Как в модели опухоли B16-OVA, так и в модели CT26, с помощью стратегии "прайм-пулл" достигался лучший контроль опухоли у мышей (Фиг. 3). Неожиданно стратегия "прайм-пулл" достигла полной регрессии в модели CT26 по меньшей мере до 60 суток после инокуляции опухоли (эксперимент продолжается до сих пор) (Фиг. 3B, открытые ромбы).

[00287] Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что как только антиген-специфических CD8 Т-клетки начинают системно генерироваться ("прайм"), местное введение агониста TLR4 в место опухоли "подтягивает" эти CD8 Т-клетки в опухоль, опосредуя

защитный иммунитет, направленный против опухолевого роста. Эти данные дают основание для использования принципа "прайм-пулл" в качестве перспективной вакцинальной стратегии для иммунотерапии рака.

[00288] Пример 4. Исследование кинетики стратегии "прайм-пулл".

[00289] В настоящее время продолжается исследование кинетики стратегии "прайм-пулл". В этом исследовании на день 0 мышам линии C57BL/6 (5 мышей на группу) подкожно, в правый фланк, прививали клетки B16OVA в количестве 1×10^5. Когда опухоли достигали размера > 4 мм^2 (день 7), мышей иммунизировали один раз VP02/OVA или контролем с несущей средой у основание хвоста. Внутриопухолевое введение 5 мкг GLA/2% SE, в качестве монотерапии, начинали, когда опухоли достигали размера > 4 мм^2 (день 7) или на день 21 и повторяли каждые 3-4 дня после этого до конца исследования. На день 22, 23 и 24 спленоциты и опухоли собирали для определения момента времени (через 1, 2 или 3 дня после последнего введения GLA/SE), когда определяется самый высокий процент лимфоцитов, проникающих в опухоль.

[00290] Пример 5. Определение фенотипа проникающих в опухоль лимфоцитов после "пулл"-введения GLA, по сравнению с исходным уровнем проникающих в опухоль лимфоцитов.

[00291] Способы. Мышам инокулировали опухолевые клетки. Мышей с опухолями затем иммунизировали VP02/A, вводимым в основание хвоста, с последующим внутриопухолевым введением GLA. После введения GLA опухоли собирали и анализировали на фенотип лимфоцитов, проникающих в опухоль, с помощью проточной цитометрии и анализа. Маркерное фенотипирование проводили на пентамер-положительных клетках, тогда как пептидную рестимуляцию использували для оценки мультипотентности и ответного уравновешивающего фенотипа.

[00292] Пример 6. Определение того, является ли "пулл"-введение GLA специфическим для антиген-специфических CD8 Т-клеток.

[00293] Способы. CFSE-меченные спленоциты адоптивно

переносили из неиммунизированных или VP02/OVA-иммунизированных мышей в "наивных" мышей с инокулированной опухолью B16/OVA, с последующим внутриопухолевым введением GLA. После введения GLA опухоли собирали и анализировали на антиген А-специфические лимфоциты, проникающих в опухоль, с помощью проточной цитометрии. Для усиления сигнала и изучения "подтягивающего" ("пулл") эффекта на CD8 и CD4 клетки, мышей OT-I (CD8) или OT-II (CD4) иммунизировали и использовали в качестве доноров в эксперименте адоптивного переноса.

[00294] Пример 7. Оценка того, является ли "пулл"-введение GLA антиген-зависимым.

[00295] Способы. Мышам инокулировали опухолевые клетки (экспрессирующие или не экспрессирующие антиген А). Мышей с опухолями затем иммунизировали VP02/A (содержащий антиген А), вводимым в основание хвоста. Затем иммунизированным мышам внутриопухолево вводили GLA. После введения GLA опухоли собирали и анализировали на антиген А-специфические лимфоциты, проникающих в опухоль, с помощью проточной цитометрии.

[00296] Пример 8. Мониторинг величины и кинетики "пулл"-введения GLA.

[00297] Способы. Мыши OT-I-luc представляют собой трансгенных мышей, имеющих OVA-специфические CD8 Т-клетки, которые люминесцируют в присутствии люциферазы. Эти мыши, следовательно, не нуждаются в иммунизации VP02/OVA для генерирования OVA-специфических CD8 Т-клеток, однако иммунизация, как правило, требуется для активации Т-клеток. Мышам инокулировали опухолевые клетки с последующей иммунизацией VP02/OVA, а затем внутриопухолево вводили GLA. Контрольную группу исследования ложно "праймировали" введением VP02/IrrAg. Мышам инокулировали опухолевые клетки с последующем внутриопухолевым введением GLA. Животных с опухолями визуализировали с помощью системы IVIS для оценки биолюминесцентного сигнала в пределах опухоли. Поскольку только OT-I-luc CD8 Т-клетки имеют свойства биолюминесценции, то величина сигнала непосредственно коррелирует с количеством OVA-специфических CD8 Т-клеток в опухоли. Для исследований кинетики

инокуляция опухоли не является обязательной.

[00298] Пример 9. Исследование разнообразия набора Т-клеточного рецептора у мышей при применении стратегии "прайм-пулл" по сравнению с "прайм"- или "пулл"-введениями отдельно, или при отсутствии лечения.

[00299] Способы. Мышам инокулировали опухолевые клетки. Мышей с опухолями затем (1) иммунизировали VP02/A, вводимым в основание хвоста, с последующим внутриопухолевым введением GLA или (2) иммунизировали только VP02/A, или (3) инъекционно внутриопухолево вводили GLA, или (4) не лечили. Опухоли и селезенки собирали и анализировали с помощью анализа Т-клеточного рецептора лимфоцитов и спленоцитов, проникающих в опухоль, посредством глубокого секвенирования. Предполагается, что у мышей, для которых применялась статегия "прайм-пулл", отмечается наибольшее клональное разнообразие как в селезеночных лимфоцитах, так и TIL.

[00300] Различные варианты реализации изобретения, описанные выше, могут быть объединены с целью обеспечения дополнительных вариантов реализации изобретения. Все патенты США, публикации заявок на патенты США, заявки на патенты США, иностранные патенты, иностранные заявки на патент и не патентные публикации, упомянутые в настоящем описании и/или перечисленные в информационном листке заявки, включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Аспекты вариантов реализации изобретения могут быть модифицированы, если это необходимо для использования концепции различных патентов, заявок и публикаций с целью обеспечения еще дополнительных вариантов реализации изобретения.

Примеры вариантов реализации изобретения

[00301] 1. Способ лечения рака, включающий:

а) введение субъекту первой композиции, содержащей частицу вирусного вектора, причем частица вирусного вектора включает рекомбинантный экспрессионный вектор, при этом рекомбинантный экспрессионный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий антиген, ассоциированный с раком, и при этом полинуклеотид функционально связан по меньшей мере с одной

последовательностью, регулирующей экспрессию, вследствие чего индуцируется иммунный ответ, направленный против антигена, ассоциированного с раком, у субъекта; и

b) местное введение субъекту второй композиции, содержащей фармацевтически приемлемый адъювант, при этом композиция не содержит антиген;

при этом как первая композиция, так и вторая композиция дополнительно содержат фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, и при этом первую композицию и вторую композицию вводят одновременно или последовательно.

[00302] 2. Способ по варианту реализации изобретения 1, отличающийся тем, что рак представляет собой рак, индуцированный онкогенным вирусом.

[00303] 3. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что антиген, ассоциированный с раком, представляет собой антиген, полученный из онкогенного вируса.

[00304] 4. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что первая композиция вводится системно с помощью первого пути, а вторая композиция вводится местно с помощью второго пути.

[00305] 5. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что первый путь представляет собой внутримышечный, внутрикожный или подкожный, а второй путь представляет собой внутриопухолевый, интранодальный, через слизистую оболочку или внутрипузырный.

[00306] 6. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что фармацевтически приемлемый адъювант представляет собой агонист TLR4.

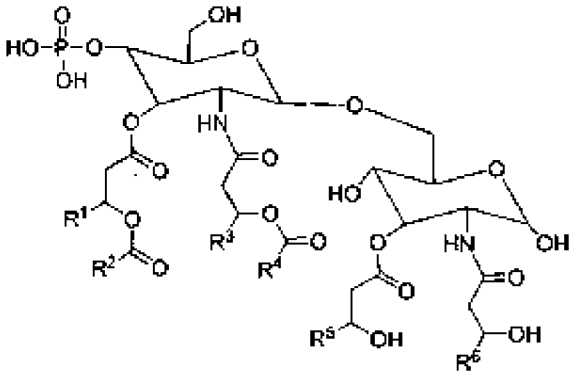
[00307] 7. Способ по по варианту реализации изобретения 6, отличающийся тем, что агонист TLR4 представляет собой адъювант, связанный с нетоксичным липидом А.

[00308] 8. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что адъювант, связанный с нетоксичным липидом А, представляет собой глюкопиранозил липид А (GLA).

[00309] 9. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что GLA готовится в виде стабильной эмульсии типа масло в воде.

[00310] 10. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что GLA имеет формулу:

(I)

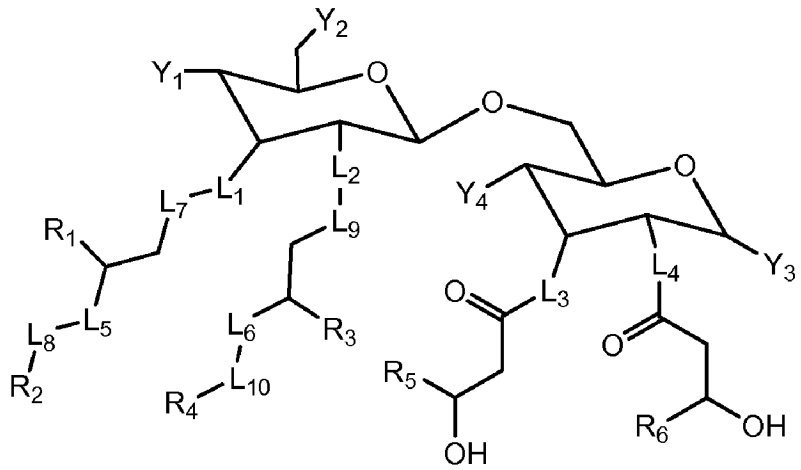


где: R^1, R^3, R^5 и R^6 представляют собой алкил C_{11}-C_{20}; а R^2 и R^4 представляют собой алкил C_{12}-C_{20}.

[00311] 11. Способ по варианту реализации изобретения 10, отличающийся тем, что R^1, R^3, R^5 и R^6 равны ундецилу, а R^2 и R^4 равны тридецилу.

[00312] 12. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что GLA имеет формулу:

[00313] (II)



или его фармацевтически приемлемая соль, где: L1, L2, L3, L4, L5 и L6 являются одинаковыми или отличающимися и независимо выбранными из -O-, -NH- и - (CH2) -; L7, L8, L9 и L10 являются одинаковыми или отличающимися, и при любом проявлении могут быть либо отсутствующими, либо -C(=O)-; Y1 представляет собой

кислотную функциональную группу; Y2 и Y3 являются одинаковыми или отличающимися, и каждый независимо выбран из -OH, -SH и кислотной функциональной группы; Y4 представляет собой -OH или -SH; R1, R3, R5 и R6 являются одинаковыми или отличающимися, и каждый независимо выбран из группы, включающей алкил C8-C13; и R2 и R4 являются одинаковыми или отличающимися, и каждый независимо выбран из группы, включающей алкил C6-C11.

[00314] 13. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что первую композицию вводят до введения второй композиции.

[00315] 14. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что первую композицию и/или вторую композицию вводят 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз.

[00316] 15. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что рекомбинантный экспрессионный вектор выбирается из ретровирусного векторного генома, лентивирусного векторного генома, поксвирусного векторного генома, векторного генома вируса осповакцины, аденовирусного векторного генома, векторного генома вируса, ассоциированного с аденовирусом, герпесвирусного векторного генома, альфа-вирусного векторного генома, плазмидной ДНК и РНК.

[00317] 16. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что частица вирусного вектора представляет собой лентивирусную векторную частицу, которая содержит лентивирусный векторный геном; поксвирусную векторную частицу, которая содержит поксвирусный векторный геном; векторную частицу вируса осповакцины, которая содержит геном вируса осповакцины; аденовирусную векторную частицу, которая содержит аденовирусный векторный геном; векторную частицу вируса, ассоциированного с аденовирусом, которая содержит векторный геном вируса, ассоциированного с аденовирусом; герпесвирусную векторную частицу, которая содержит герпесвирусный векторный геном; или альфа-вирусную векторную частицу, которая содержит альфа-вирусный векторный геном.

[00318] 17. Способ по любому из предшествующих вариантов

реализации изобретения, отличающийся тем, что частица вирусного вектора представляет собой лентивирусную векторную частицу и содержит лентивирусный векторный геном.

[00319] 18. Способ по предыдущих вариантах реализации изобретения, отличающийся тем, что лентивирусная векторная частица дополнительно содержит оболочку, содержащую гликопротеин E2 вируса Синдбис, имеющего по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с SEQ ID NO:1, причем остаток 160 либо отсутствует, либо аминокислота не является глутаминовой кислотой, и при этом гликопротеид E2 не является частью слитого белка с белком E3 вируса Синдбис.

[00320] 19. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что частица вирусного вектора доставляет рекомбинантный экспрессионный вектор к дендритной клетке.

[00321] 20. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что антиген, ассоциированный с раком, выбирается из p53, Ras, c-Myc, A-Raf, B-Raf, C-Raf, циклин-зависимых киназ, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSA, PSM, тирозиназы, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, фосфоинозитидных 3-киназ (PI3K), рецепторов TRK, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, антигена опухоли Вильмса (WT1), AFP, β-катенина/m, каспазы-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, миозина/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, аннексина II, CDC27/m, TPI/mbcr-abl, BCR-ABL, регуляторного фактора интерферона 4 (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RARα, опухолеассоциированного преобразователя сигнала кальция 1 (TACSTD1) TACSTD2, рецепторных тирозинкиназ, рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), EGFRvIII, рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGFR), рецептора фактора роста сосудистого эндотелия (VEGFR), цитоплазматических тирозинкиназ, src-семейства, syk-ZAP70, интегрин-связанной киназы (ILK),

преобразователей сигналов и активаторов транскрипции STAT3, STAT5 и STAT6, факторов, индуцируемых гипоксией, HIF-1α и HIF-2α, ядерного фактора-каппа B (NF-κB), рецепторов Notch, Notch1-4, c-Met, мишеней рапамицина у млекопитающих (mTOR), WNT, киназ, регулируемых внеклеточными сигналами (ERK), PMSA, PR-3, MDM2, мезотелина, раковых клеток почек - 5T4, SM22-альфа, карбоангидраз I (CAI) и IX (CAIX), STEAD, TEL/AML1, GD2, протеиназы 3, hTERT, контрольных точек транслокации саркомы, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (слитый ген TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, андрогенового рецептора, циклина B1, полисиаловой кислоты, MYCN, RhoC, GD3, фукозила GM1, мезотелиана, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboH, NY-BR-1, RGs5, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, белка спермы 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, легумаина, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2, и fos-связанного антигена 1.

[00322] 21. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что антиген, ассоциированный с раком, выбирается из CTA, NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10, GAGE, PRAME; BAGE; RAGE, SAGE, HAGE, MPHOSPH1, DEPDC1, IMP3, MAGE-A и T-антигена BK.

[00323] 22. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что рак представляет собой рак мочевого пузыря.

[00324] 23. Способ по любому из предыдущих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что вторая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый адъювант, дополнительно содержит БЦЖ.

[00325] 24. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что вторая композиция вводится в комбинации с композицией, содержащей один или более терапевтических агентов, выбранных из группы, состоящей из ингибитора контрольной точки (например, анти-PD1, анти-PDL1, анти-CTLA4 и тому подобное), цитокина, хлорохина, антитела, которое увеличивает ADCC, антитела, которое активирует

костимуляторный сигнал, или антитела анти-CD40.

[00326] 25. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что первая композиция дополнительно содержит адъювант.

[00327] 26. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, дополнительно включающий введение бустерной композиции, содержащей адъювант в комбинации с полипептидом, при этом полипептид содержит антиген, ассоциированный с раком, или его иммуногенный фрагмент.

[00328] 27. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что индуцированный иммунный ответ включает иммунный ответ цитотоксических Т-лимфоцитов.

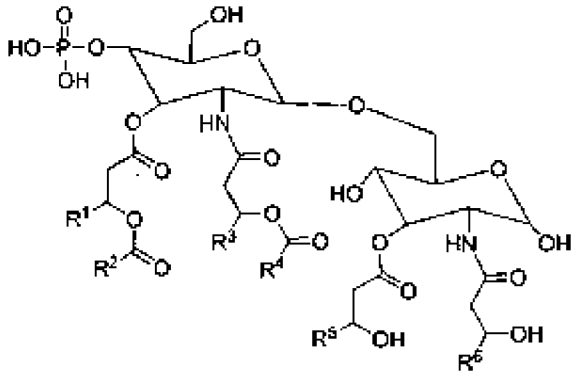
[00329] 28. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что местное введение второй композиции индуцирует увеличение количества CD8+ Т-клеток в локальном месте введения.

[00330] 29. Набор, содержащий первую композицию и вторую композицию согласно любому из предшествующих вариантов реализации изобретения.

[00331] 30. Способ лечения рака, включающий:

а) индуцирование у субъекта иммунного ответа, специфического для иммуногена, ассоциированного с раком, включающее введение субъекту первой композиции, содержащей лентивирусную векторную частицу, причем лентивирусная векторная частица содержит рекомбинантный экспрессионный вектор, при этом рекомбинантный экспрессионный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий иммуноген, при этом полинуклеотид функционально связан по меньшей мере с одной регулирующей экспрессию последовательностью, при этом лентивирусная векторная частица дополнительно содержит оболочку, содержащую гликопротеин E2 вируса Синдбис, имеющий по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с SEQ ID NO:1, при этом остаток 160 либо отсутствует, либо аминокислота не является глутаминовой кислотой, и при этом гликопротеид E2 не является частью слитого белка с белком E3 вируса Синдбис; и

b) внутриопухолевое введение второй композиции, содержащей фармацевтически приемлемый адъювант, при этом вторая композиция не содержит иммуноген, и при этом адъювант является адъювантом, связанным с нетоксичным липидом А, представляющим собой глюкопиранозил липид А (GLA), приготовленный в стабильной эмульсии типа масло в воде, при этом GLA имеет формулу:



где: R^1, R^3, R^5 и R^6 равны ундецилу, а R^2 и R^4 равны тридецилу;

при этом иммуноген, ассоциированный с раком, выбирается из CTA, NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10, GAGE, PRAME; BAGE; RAGE, SAGE, HAGE, MPHOSPH1, DEPDC1, IMP3 и MAGE-A;

при этом как первая композиция, так и вторая композиция дополнительно содержат фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, и при этом первую композицию и вторую композицию вводят одновременно или последовательно, причем первую композицию вводят внутримышечно, внутрикожно или подкожно.

[00332] 31. Способ лечения рака у субъекта, включающий:

a) введение субъекту первой композиции, содержащей

i) антиген-специфические Т-клетки, специфические для антигена, ассоциированного с раком, при этом указанные антиген-специфические Т-клетки увеличены в количестве *ex vivo*,

ii) Т-клетки, которые были генетически модифицированы для экспрессии рецептора химерного антигена (CAR), распознающего антиген, ассоциированный с раком, или

iii) Т-клетки, которые были генетически модифицированы для экспрессии специфического химерного Т-клеточного рецептора (TCR), распознающего антиген, ассоциированный с раком, в

контексте MHC; и

b) внутриопухолевое введение субъекту второй композиции, содержащей фармацевтически приемлемый адъювант, при этом вторая композиция не содержит антиген; или необязательно содержит антиген, такой как антиген, ассоциированный с раком, указанный в любом из предшествующих вариантов реализации изобретения;

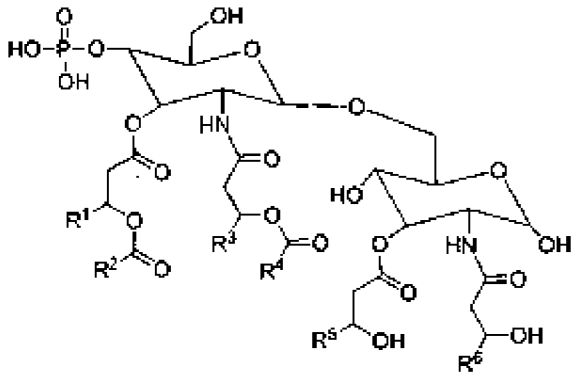
при этом как первая композиция, так и вторая композиция дополнительно содержат фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, и при этом первую композицию и вторую композицию вводят одновременно или последовательно.

[00333] 32. Способ по варианту реализации изобретения 31, отличающийся тем, что адъювант представляет собой адъювант, связанный с нетоксичным липидом A.

[00334] 33. Способ по варианту реализации изобретения 31, отличающийся тем, что адъювант представляет собой глюкопиранозил липид A (GLA).

[00335] 34. Способ по варианту реализации изобретения 33, отличающийся тем, что GLA готовится в виде стабильной эмульсии типа масло в воде.

[00336] 35. Способ по варианту реализации изобретения 33 или варианту реализации изобретения 34, отличающийся тем, что GLA имеет формулу:



где: R^1, R^3, R^5 и R^6 представляют собой алкил C_{11}-C_{20}; а R^2 и R^4 представляют собой алкил C_{12}-C_{20}.

[00337] 36. Способ по варианту реализации изобретения 35, отличающийся тем, что R^1, R^3, R^5 и R^6 равны ундецилу и R^2 и R^4 равны тридецилу.

[00338] 37. Композиция, содержащая

a) первую композицию, содержащую частицу вирусного вектора, причем частица вирусного вектора включает рекомбинантный экспрессионный вектор, при этом рекомбинантный экспрессионный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий антиген, ассоциированный с раком, и при этом полинуклеотид функционально связан по меньшей мере с одной последовательностью, регулирующей экспрессию, вследствие чего индуцируется иммунный ответ, направленный против антигена, ассоциированного с раком, у субъекта; и

b) вторую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый адъювант, при этом вторая композиция не содержит антиген;

при этом как первая композиция, так и вторая композиция дополнительно содержат фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество для применения в способе лечения рака, при этом первую композицию вводят субъекту системно, при этом вторую композицию вводят субъекту местно; и при этом первую композицию и вторую композицию вводят одновременно или последовательно.

[00339] 38. Композиция по варианту реализации изобретения 37, отличающаяся тем, что рак представляет собой рак, индуцированный онкогенным вирусом.

[00340] 39. Композиция по варианту реализации изобретения 38, отличающаяся тем, что антиген, ассоциированный с раком, представляет собой антиген, полученный из онкогенного вируса.

[00341] 40. Композиция по варианту реализации изобретения 37, отличающаяся тем, что первая композиция вводится системно с помощью первого пути, а вторая композиция вводится местно с помощью второго пути.

[00342] 41. Композиция по варианту реализации изобретения 40, отличающаяся тем, что первый путь представляет собой внутримышечный, внутрикожный или подкожный, а второй путь представляет собой внутриопухолевый, интранодальный, через слизистую оболочку или внутрипузырный.

[00343] 42. Композиция по варианту реализации изобретения 37, отличающаяся тем, что фармацевтически приемлемый адъювант представляет собой агонист TLR4.

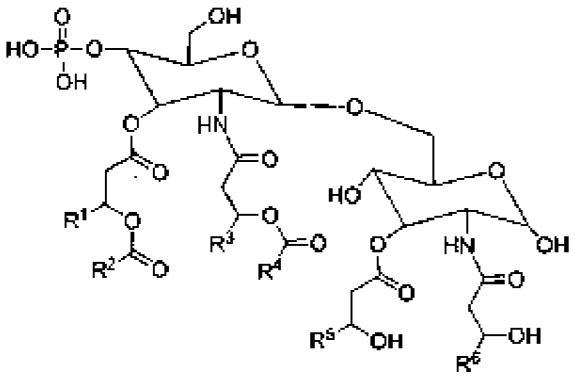
[00344] 43. Композиция по варианту реализации изобретения 42, отличающаяся тем, что агонист TLR4 представляет собой адъювант, связанный с нетоксичным липидом А.

[00345] 44. Композиция по варианту реализации изобретения 43, отличающаяся тем, что адъювант, связанный с нетоксичным липидом А, представляет собой глюкопиранозил липид А (GLA).

[00346] 45. Композиция по варианту реализации изобретения 44, отличающаяся тем, что GLA готовится в виде стабильной эмульсии типа масло в воде.

[00347] 46. Композиция по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающаяся тем, что GLA имеет формулу:

(I)

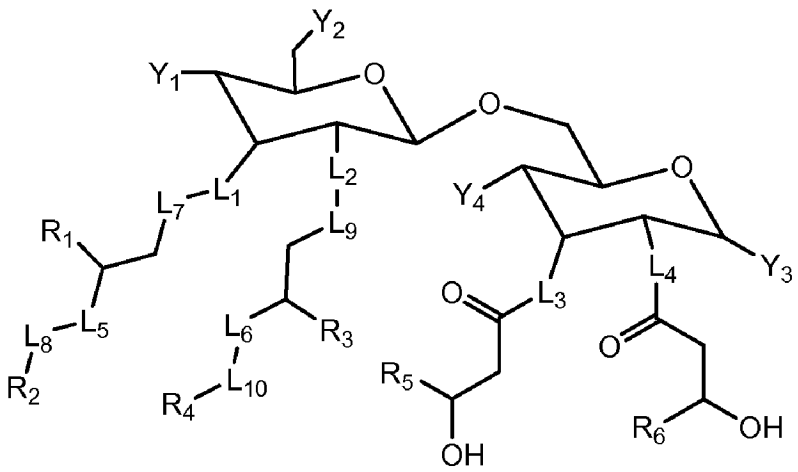


где: R^1, R^3, R^5 и R^6 представляют собой алкил C_{11}-C_{20}; а R^2 и R^4 представляют собой алкил C_{12}-C_{20}.

[00348] 47. Композиция по варианту реализации изобретения 46, отличающаяся тем, что R^1, R^3, R^5 и R^6 равны ундецилу, а R^2 и R^4 равны тридецилу.

[00349] 48. Композиция по любому из вариантов реализации изобретения 44-45, отличающаяся тем, что GLA имеет формулу:

(II)



или его фармацевтически приемлемая соль, где: L1, L2, L3, L4, L5 и L6 являются одинаковыми или отличающимися и независимо выбранными из -O-, -NH- и - (CH2) -; L7, L8, L9 и L10 являются одинаковыми или отличающимися, и при любом проявлении могут быть либо отсутствующими, либо -C(=O)-; Y1 представляет собой кислотную функциональную группу; Y2 и Y3 являются одинаковыми или отличающимися, и каждый независимо выбран из -OH, -SH и кислотной функциональной группы; Y4 представляет собой -OH или -SH; R1, R3, R5 и R6 являются одинаковыми или отличающимися, и каждый независимо выбран из группы, включающей алкил C8-C13; и R2 и R4 являются одинаковыми или отличающимися, и каждый независимо выбран из группы, включающей алкил C6-C11.

[00350] 49. Композиция по любому из вариантов реализации изобретения 37-45, отличающаяся тем, что первую композицию вводят до введения второй композиции.

[00351] 50. Композиция по любому из вариантов реализации изобретения 37-45, отличающаяся тем, что первую композицию и/или вторую композицию вводят 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз.

[00352] 51. Композиция по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающаяся тем, что рекомбинантный экспрессионный вектор выбирается из ретровирусного векторного генома, лентивирусного векторного генома, поксвирусного векторного генома, векторного генома вируса осповакцины, аденовирусного векторного генома, векторного генома вируса, ассоциированного с аденовирусом, герпесвирусного векторного генома, альфа-вирусного векторного генома, плазмидной

ДНК и РНК.

[00353] 52. Композиция по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающаяся тем, что частица вирусного вектора представляет собой лентивирусную векторную частицу, которая содержит лентивирусный векторный геном; поксвирусную векторную частицу, которая содержит поксвирусный векторный геном; векторную частицу вируса осповакцины, которая содержит геном вируса осповакцины; аденовирусную векторную частицу, которая содержит аденовирусный векторный геном; векторную частицу вируса, ассоциированного с аденовирусом, которая содержит векторный геном вируса, ассоциированного с аденовирусом; герпесвирусную векторную частицу, которая содержит герпесвирусный векторный геном; или альфа-вирусную векторную частицу, которая содержит альфа-вирусный векторный геном.

[00354] 53. Композиция по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающаяся тем, что частица вирусного вектора представляет собой лентивирусную векторную частицу и содержит лентивирусный векторный геном.

[00355] 54. Композиция по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающаяся тем, что лентивирусная векторная частица дополнительно содержит оболочку, содержащую гликопротеин E2 вируса Синдбис, имеющий по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с SEQ ID NO:1, при этом остаток 160 либо отсутствует, либо аминокислота не является глутаминовой кислотой, и при этом гликопротеид E2 не является частью слитого белка с белком E3 вируса Синдбис.

[00356] 55. Композиция по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающаяся тем, что частица вирусного вектора доставляет рекомбинантный экспрессионный вектор к дендритной клетке.

[00357] 56. Композиция по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающаяся тем, что антиген, ассоциированный с раком, выбирается из CTA, NY-ESO-1, LAGE-1,MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10, GAGE, PRAME; BAGE; RAGE, SAGE, HAGE, MPHOSPH1, DEPDC1, IMP3 MAGE-A, T-антигена ВК, p53, Ras, c-Myc, A-Raf, B-Raf, C-Raf, циклин-

зависимых киназ, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSA, PSM, тирозиназы, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, фосфоинозитидных 3-киназ (PI3K), рецепторов TRK, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, антигена опухоли Вильмса (WT1), AFP, β-катенина/m, каспазы-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, миозина/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, аннексина II, CDC27/m, TPI/mbcr-abl, BCR-ABL, регуляторного фактора интерферона 4 (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RARα, опухолеассоциированного преобразователя сигнала кальция 1 (TACSTD1) TACSTD2, рецепторных тирозинкиназ, рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), EGFRvIII, рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGFR), рецептора фактора роста сосудистого эндотелия (VEGFR), цитоплазматических тирозинкиназ, src-семейства, syk-ZAP70, интегрин-связанной киназы (ILK), преобразователей сигналов и активаторов транскрипции STAT3, STAT5 и STAT6, факторов, индуцируемых гипоксией, HIF-1α и HIF-2α, ядерного фактора-каппа в (NF-κB), рецепторов Notch, Notch1-4, c-Met, мишеней рапамицина у млекопитающих (mTOR), WNT, киназ, регулируемых внеклеточными сигналами (ERK), PMSA, PR-3, MDM2, мезотелина, раковых клеток почек - 5T4, SM22-альфа, карбоангидраз I (CAI) и IX (CAIX), STEAD, TEL/AML1, GD2, протеиназы 3, hTERT, контрольных точек транслокации саркомы, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (слитый ген TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, андрогенового рецептора, циклина B1, полисиаловой кислоты, MYCN, RhoC, GD3, фукозила GM1, мезотелиана, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboH, NY-BR-1, RGs5, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, белка спермы 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, легумаина, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2 и fos-связанного антигена 1.

[00358] 58. Композиция по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающаяся тем, что рак представляет собой рак мочевого пузыря.

[00359] 59. Композиция по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающаяся тем, что вторая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый адъювант, дополнительно содержит БЦЖ.

[00360] 60. Композиция по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающаяся тем, что вторую композицию вводят в комбинации с композицией, содержащей терапевтический агент, выбранный из группы, состоящей из ингибитора контрольной точки, цитокина, хлорохина, антитела, которое повышает ADCC, антитела, которое активирует костимуляторный сигнал, антитела анти-CD40.

[00361] 61. Композиция по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающаяся тем, что первая композиция дополнительно содержит адъювант.

[00362] 62. Композиция по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, дополнительно включающая введение бустерной композиции, содержащей адъювант в комбинации с полипептидом, при этом полипептид содержит антиген, ассоциированный с раком, или его иммуногенный фрагмент.

[00363] 63. Композиция по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающаяся тем, что индуцированный иммунный ответ включает иммунный ответ цитотоксических Т-лимфоцитов.

[00364] 64. Композиция по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающаяся тем, что местное введение второй композиции индуцирует увеличение количества CD8+ Т-клеток в локальном месте введения.

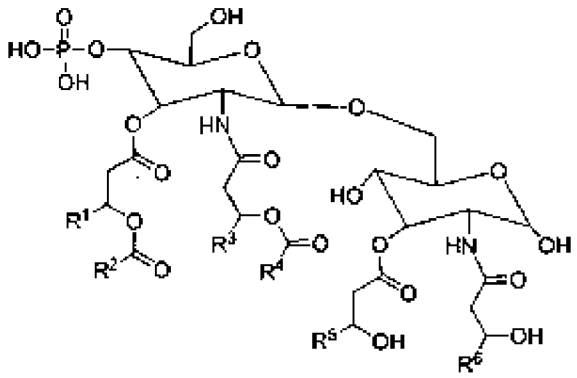
[00365] 65. Набор, включающий первую композицию и вторую композицию по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения.

[00366] 66. Композиция, содержащая:

а) первую композицию, содержащую лентивирусную векторную частицу, причем лентивирусная векторная частица содержит рекомбинантный экспрессионный вектор, при этом рекомбинантный экспрессионный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий иммуноген, ассоциированный с раком, при этом полинуклеотид

функционально связан по меньшей мере с одной регулирующей экспрессию последовательностью; при этом лентивирусная векторная частица дополнительно содержит оболочку, содержащую гликопротеин E2 вируса Синдбис, имеющий по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с SEQ ID NO:1, при этом остаток 160 либо отсутствует, либо аминокислота не является глутаминовой кислотой, и при этом гликопротеид E2 не является частью слитого белка с белком E3 вируса Синдбис; и

b) вторую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый адъювант, при этом вторая композиция не содержит иммуноген, при этом адъювант является адъювантом, связанным с нетоксичным липидом A, представляющим собой глюкопиранозил липид A (GLA), приготовленный в стабильной эмульсии типа масло в воде, при этом GLA имеет формулу:



где: R^1, R^3, R^5 и R^6 равны ундецилу, а R^2 и R^4 равны тридецилу;

при этом иммуноген, ассоциированный с раком, выбирается из CTA, NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10, GAGE, PRAME; BAGE; RAGE, SAGE, HAGE, MPHOSPH1, DEPDC1, IMP3 и MAGE-A;

при этом как первая композиция, так и вторая композиция дополнительно содержат фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество для применения в способе лечения рака, при этом первая композиция вводится внутримышечно, внутрикожно или подкожно и индуцирует у субъекта иммунный ответ, специфический для иммуногена, ассоциированного с раком; при этом вторая композиция вводится внутриопухолево; при этом первую композицию и вторую композицию вводят одновременно или последовательно.

[00367] 67. Композиция, содержащая:

a) первую композицию, содержащую

i) аутологичные или гетерологичные антиген-специфические Т-клетки, специфические для антигена, ассоциированного с раком, при этом указанные антиген-специфические Т-клетки увеличены в количестве *ex vivo*,

ii) аутологичные или гетерологичные антиген-специфические Т-клетки, которые были генетически модифицированы для экспрессии рецептора химерного антигена (CAR), распознающего антиген, ассоциированный с раком, или

iii) Т-клетки, которые были генетически модифицированы для экспрессии специфического химерного Т-клеточного рецептора (TCR), распознающего антиген, ассоциированный с раком, в контексте MHC; и

b) вторую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый адъювант; при этом вторая композиция не содержит иммуноген;

при этом как первая композиция, так и вторая композиция дополнительно содержат фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество;

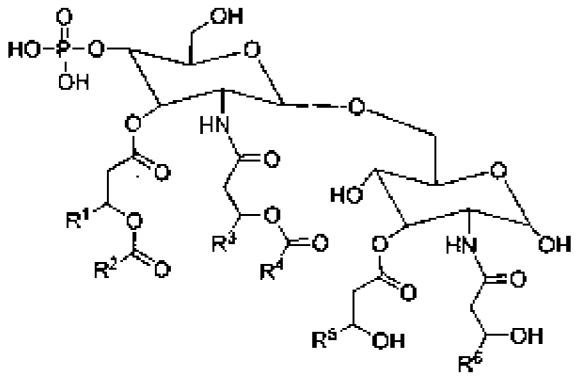
для применения в способе лечения рака, при этом первую композицию вводят субъекту системно; при этом вторую композицию вводят субъекту внутриопухолево и при этом первая композиция и вторая композиция вводятся одновременно или последовательно.

[00368] 68. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что адъювант представляет собой адъювант, связанный с нетоксичным липидом A.

[00369] 69. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что адъювант представляет собой глюкопиранозил липид A (GLA).

[00370] 70. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что GLA готовится в виде стабильной эмульсии типа масло в воде.

[00371] 71. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что GLA имеет формулу:



где: R^1, R^3, R^5 и R^6 представляют собой алкил C_{11}-C_{20}; а R^2 и R^4 представляют собой алкил C_{12}-C_{20}.

[00372] 72. Способ по любому из предшествующих вариантов реализации изобретения, отличающийся тем, что R^1, R^3, R^5 и R^6 равны ундецилу, а R^2 и R^4 равны тридецилу.

[00373] 73. Способ увеличения количества Т-клеток в опухолевом микроокружении, включающий:

a) введение субъекту, имеющему опухоль, первой композиции, содержащей векторную частицу, причем векторная частица содержит рекомбинантный экспрессионный вектор, при этом рекомбинантный экспрессионный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий антиген, ассоциированный с раком, и при этом полинуклеотид функционально связан по меньшей мере с одной регулирующей экспрессию последовательностью, тем самым индуцируя у субъекта иммунный ответ против антигена, ассоциированного с раком; и

b) введение субъекту внутриопухолево или перитуморально второй композиции, содержащей агонист TLR4, при этом композиция не содержит антиген;

при этом как первая композиция, так и вторая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, и при этом первую композицию и вторую композицию вводят одновременно или последовательно;

[00374] тем самым увеличивая количество Т-клеток в опухолевом микроокружении.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ
<110> IMMUNE DESIGN CORP

<120> ИММУНОТЕРАПИЯ РАКА С ПРИМЕНЕНИЕМ КОМБИНАЦИИ МЕСТНОЙ И СИСТЕМНОЙ ИММУННОЙ СТИМУЛЯЦИИ

<130> 31943/48357

<150> US-61/940109
<151> 2014-02-14

<150> US-61/985787
<151> 2014-04-29

<150> US-62/022070
<151> 2014-07-08

<150> US-62/072548
<151> 2014-10-30

<150> US-62/101335
<151> 2015-01-08

<160> 45

<170> PatentIn версии 3.5

<210> 1
<211> 423
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<220>
<221> misc_feature
<222> (160)..(160)
<223> Xaa может представлять собой любую встречающуюся в природе аминокислоту

<400> 1

Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys
1 5 10 15

Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu
20 25 30

Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr Ser
35 40 45

Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys Tyr
50 55 60

Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr Met
65 70 75 80

Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser Tyr
85 90 95

```
Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val Thr
            100                 105                 110

Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala Arg
        115                 120                 125

Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro Pro
    130                 135                 140

Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys Xaa
145                 150                 155                 160

Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr
                165                 170                 175

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

Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr
        195                 200                 205

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

Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser
225                 230                 235                 240

Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His
                245                 250                 255

Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His
            260                 265                 270

Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp
        275                 280                 285

Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
    290                 295                 300

Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
305                 310                 315                 320

Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
                325                 330                 335

Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
            340                 345                 350
```

```
His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
        355                 360                 365

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
    370                 375                 380

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
385                 390                 395                 400

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
                405                 410                 415

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
            420
```

<210> 2
<211> 986
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<400> 2

```
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1               5                   10                  15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
            20                  25                  30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
        35                  40                  45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Ser Val Ile
    50                  55                  60

Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys Ser Tyr Cys
65                  70                  75                  80

His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu Gln Val Trp
                85                  90                  95

Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr Ser Ala Gln Phe
            100                 105                 110

Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys Tyr Arg Tyr Met
        115                 120                 125

Ser Leu Lys Gln Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Thr Val
    130                 135                 140

Lys Glu Gly Thr Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys
```

```
145                 150                 155                 160

Arg Arg Leu Ser Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro
                165                 170                 175

Gly Asp Ser Val Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser
            180                 185                 190

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

Tyr Asp Leu Pro Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr
    210                 215                 220

Asp Arg Leu Ala Ala Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro
225                 230                 235                 240

Arg Pro His Ala Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val
                245                 250                 255

Tyr Ala Lys Pro Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys
            260                 265                 270

Gly Asp Tyr Lys Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly
        275                 280                 285

Cys Thr Ala Ile Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys
    290                 295                 300

Trp Val Phe Asn Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala
305                 310                 315                 320

Gln Gly Lys Leu His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met
                325                 330                 335

Val Pro Val Ala His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile
            340                 345                 350

Ser Leu Gln Leu Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg
        355                 360                 365

Leu Gly Ala Asn Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr
    370                 375                 380

Val Arg Asn Phe Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly
385                 390                 395                 400

Asn His Glu Pro Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp
```

405 410 415

Pro His Gly Trp Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His
420 425 430

Pro Val Tyr Thr Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met
435 440 445

Ile Gly Val Thr Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu
450 455 460

Cys Leu Thr Pro Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser
465 470 475 480

Leu Ala Leu Leu Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr
485 490 495

Glu Thr Met Ser Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val
500 505 510

Gln Leu Cys Ile Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys
515 520 525

Ser Cys Cys Leu Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys
530 535 540

Val Asp Ala Tyr Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile
545 550 555 560

Pro Tyr Lys Ala Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu
565 570 575

Glu Ile Thr Val Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu
580 585 590

Tyr Ile Thr Cys Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys
595 600 605

Cys Cys Gly Ser Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Gly Tyr Thr
610 615 620

Cys Lys Val Phe Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln
625 630 635 640

Cys Phe Cys Asp Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu
645 650 655

Leu Ser Ala Asp Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His

```
            660                 665                 670

Thr Ala Ala Met Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr
        675                 680                 685

Ser Phe Leu Asp Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys
    690                 695                 700

Asp Leu Lys Val Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe
705                 710                 715                 720

Asp His Lys Val Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe
                725                 730                 735

Pro Glu Tyr Gly Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala
            740                 745                 750

Thr Ser Leu Thr Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu
        755                 760                 765

Leu Lys Pro Ser Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser
    770                 775                 780

Ser Gly Phe Glu Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu
785                 790                 795                 800

Thr Ala Pro Phe Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val
                805                 810                 815

Asp Cys Ser Tyr Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala
            820                 825                 830

Ala Phe Ile Arg Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys
        835                 840                 845

Glu Val Ser Glu Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr
    850                 855                 860

Leu Gln Tyr Val Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His
865                 870                 875                 880

Ser Ser Thr Ala Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys
                885                 890                 895

Gly Ala Val Thr Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe
            900                 905                 910

Ile Val Ser Leu Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys
```

915 920 925

Pro Pro Ala Asp His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu
930 935 940

Phe Gln Ala Ala Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu
945 950 955 960

Phe Gly Gly Ala Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala
965 970 975

Cys Ser Met Met Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980 985

<210> 3
<211> 982
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<400> 3

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

```
Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
                165                 170                 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
            180                 185                 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
        195                 200                 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu
    210                 215                 220

Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
225                 230                 235                 240

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
                245                 250                 255

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
            260                 265                 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
        275                 280                 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
    290                 295                 300

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
305                 310                 315                 320

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
                325                 330                 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
            340                 345                 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
        355                 360                 365

Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
    370                 375                 380

Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
385                 390                 395                 400

Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
                405                 410                 415
```

```
Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
            420                 425                 430

Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
        435                 440                 445

Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
    450                 455                 460

Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
465                 470                 475                 480

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
                485                 490                 495

Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
            500                 505                 510

Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu
        515                 520                 525

Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr
    530                 535                 540

Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala
545                 550                 555                 560

Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
                565                 570                 575

Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
            580                 585                 590

Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
        595                 600                 605

Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
    610                 615                 620

Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
625                 630                 635                 640

Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
                645                 650                 655

Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
            660                 665                 670
```

```
Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
        675                 680                 685

Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
    690                 695                 700

Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
705                 710                 715                 720

Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
                725                 730                 735

Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
            740                 745                 750

Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
        755                 760                 765

Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
    770                 775                 780

Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
785                 790                 795                 800

Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
                805                 810                 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
            820                 825                 830

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
        835                 840                 845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
    850                 855                 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865                 870                 875                 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
                885                 890                 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
            900                 905                 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
        915                 920                 925
```

```
His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
    930                 935                 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945                 950                 955                 960

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
                965                 970                 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
            980
```

<210> 4
<211> 982
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<400> 4

```
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1               5                   10                  15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
            20                  25                  30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
        35                  40                  45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
    50                  55                  60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65                  70                  75                  80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
                85                  90                  95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
            100                 105                 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
        115                 120                 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
    130                 135                 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145                 150                 155                 160
```

```
Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
                165                 170                 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
            180                 185                 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
        195                 200                 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu
    210                 215                 220

Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
225                 230                 235                 240

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
                245                 250                 255

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
            260                 265                 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
        275                 280                 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
    290                 295                 300

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
305                 310                 315                 320

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
                325                 330                 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
            340                 345                 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
        355                 360                 365

Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
    370                 375                 380

Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
385                 390                 395                 400

Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
                405                 410                 415
```

```
Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
            420                 425                 430

Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
        435                 440                 445

Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
    450                 455                 460

Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
465                 470                 475                 480

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
                485                 490                 495

Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
            500                 505                 510

Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu
        515                 520                 525

Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr
    530                 535                 540

Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala
545                 550                 555                 560

Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
                565                 570                 575

Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
            580                 585                 590

Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
        595                 600                 605

Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
    610                 615                 620

Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
625                 630                 635                 640

Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
                645                 650                 655

Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
            660                 665                 670
```

```
Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
        675                 680                 685

Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
    690                 695                 700

Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
705                 710                 715                 720

Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
                725                 730                 735

Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
            740                 745                 750

Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
        755                 760                 765

Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
    770                 775                 780

Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
785                 790                 795                 800

Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
                805                 810                 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
            820                 825                 830

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
        835                 840                 845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
    850                 855                 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865                 870                 875                 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
                885                 890                 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
            900                 905                 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
        915                 920                 925
```

```
His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
    930                 935                 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945                 950                 955                 960

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
                965                 970                 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
            980
```

<210> 5
<211> 980
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<400> 5

```
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1               5                   10                  15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
            20                  25                  30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
        35                  40                  45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
    50                  55                  60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65                  70                  75                  80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
                85                  90                  95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
            100                 105                 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
        115                 120                 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
    130                 135                 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145                 150                 155                 160
```

```
Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
                165                 170                 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
            180                 185                 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
        195                 200                 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Thr
    210                 215                 220

Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr Thr
225                 230                 235                 240

Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro Ser
                245                 250                 255

Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr Gly
            260                 265                 270

Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys Gln
        275                 280                 285

Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser Pro
    290                 295                 300

Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His Leu
305                 310                 315                 320

Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His Ala
                325                 330                 335

Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp Thr
            340                 345                 350

Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro Glu
        355                 360                 365

Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr Val
    370                 375                 380

Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val Arg
385                 390                 395                 400

Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro His
                405                 410                 415
```

```
Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile Leu
            420                 425                 430

Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val Ala
        435                 440                 445

Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr Ala
    450                 455                 460

Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys Cys
465                 470                 475                 480

Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr Leu
                485                 490                 495

Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro Leu
            500                 505                 510

Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro Phe
        515                 520                 525

Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr Glu His
    530                 535                 540

Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu Val
545                 550                 555                 560

Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val Met Ser
                565                 570                 575

Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys Lys Phe
            580                 585                 590

Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser Leu Glu
        595                 600                 605

Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe Gly Gly
    610                 615                 620

Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp Ser Glu
625                 630                 635                 640

Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys Ala
                645                 650                 655

Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys Val
            660                 665                 670
```

```
Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val Tyr
        675                 680                 685

Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile Ala
    690                 695                 700

Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val Ile
705                 710                 715                 720

His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala Met
                725                 730                 735

Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser Lys
            740                 745                 750

Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala Lys
        755                 760                 765

Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met Trp
    770                 775                 780

Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly Cys
785                 790                 795                 800

Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly Asn
                805                 810                 815

Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr Ser
            820                 825                 830

Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys Thr
        835                 840                 845

Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser Asp
    850                 855                 860

Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr Leu
865                 870                 875                 880

Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val His
                885                 890                 895

Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys Gly
            900                 905                 910

Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His Ile
        915                 920                 925
```

Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile Ser
930 935 940

Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser Ser
945 950 955 960

Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu Thr
965 970 975

Ser Thr Arg Arg
980

<210> 6
<211> 981
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<400> 6

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val

```
                165                 170                 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
            180                 185                 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
        195                 200                 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu
    210                 215                 220

Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr
225                 230                 235                 240

Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro
                245                 250                 255

Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr
            260                 265                 270

Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys
        275                 280                 285

Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser
    290                 295                 300

Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His
305                 310                 315                 320

Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His
                325                 330                 335

Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp
            340                 345                 350

Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
        355                 360                 365

Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
    370                 375                 380

Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
385                 390                 395                 400

Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
                405                 410                 415

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
```

```
            420                 425                 430

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
        435                 440                 445

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
    450                 455                 460

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
465                 470                 475                 480

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr
                485                 490                 495

Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro
            500                 505                 510

Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro
        515                 520                 525

Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr Glu
    530                 535                 540

His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu
545                 550                 555                 560

Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val Met
                565                 570                 575

Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys Lys
            580                 585                 590

Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser Leu
        595                 600                 605

Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe Gly
    610                 615                 620

Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp Ser
625                 630                 635                 640

Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys
                645                 650                 655

Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys
            660                 665                 670

Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val
```

675 680 685

Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile
690 695 700

Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val
705 710 715 720

Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala
725 730 735

Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser
740 745 750

Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala
755 760 765

Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met
770 775 780

Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly
785 790 795 800

Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly
805 810 815

Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr
820 825 830

Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys
835 840 845

Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser
850 855 860

Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr
865 870 875 880

Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val
885 890 895

His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys
900 905 910

Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
915 920 925

Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile

```
    930                 935                 940

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945                 950                 955                 960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
                965                 970                 975

Thr Ser Thr Arg Arg
            980
```

<210> 7
<211> 982
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<400> 7

```
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1               5                   10                  15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
            20                  25                  30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
        35                  40                  45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
    50                  55                  60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65                  70                  75                  80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
                85                  90                  95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
            100                 105                 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
        115                 120                 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
    130                 135                 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145                 150                 155                 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
                165                 170                 175
```

```
Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
            180                 185                 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
        195                 200                 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu
    210                 215                 220

Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
225                 230                 235                 240

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
                245                 250                 255

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
            260                 265                 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
        275                 280                 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
    290                 295                 300

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
305                 310                 315                 320

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
                325                 330                 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
            340                 345                 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
        355                 360                 365

Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
    370                 375                 380

Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
385                 390                 395                 400

Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
                405                 410                 415

Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
            420                 425                 430
```

```
Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
        435                 440                 445

Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
    450                 455                 460

Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
465                 470                 475                 480

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
                485                 490                 495

Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
            500                 505                 510

Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu
        515                 520                 525

Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr
    530                 535                 540

Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala
545                 550                 555                 560

Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
                565                 570                 575

Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
            580                 585                 590

Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
        595                 600                 605

Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
    610                 615                 620

Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
625                 630                 635                 640

Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
                645                 650                 655

Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
            660                 665                 670

Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
        675                 680                 685
```

```
Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
    690                 695                 700

Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
705                 710                 715                 720

Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
                725                 730                 735

Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
            740                 745                 750

Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
        755                 760                 765

Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
    770                 775                 780

Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
785                 790                 795                 800

Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
                805                 810                 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
            820                 825                 830

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
        835                 840                 845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
    850                 855                 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865                 870                 875                 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
                885                 890                 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
            900                 905                 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
        915                 920                 925

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
    930                 935                 940
```

```
Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945                 950                 955                 960


Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
                965                 970                 975


Leu Thr Ser Thr Arg Arg
            980
```

<210> 8
<211> 981
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<400> 8

```
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1               5                   10                  15


Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
            20                  25                  30


Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
        35                  40                  45


Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
    50                  55                  60


Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65                  70                  75                  80


Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
                85                  90                  95


Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
            100                 105                 110


Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
        115                 120                 125


Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
    130                 135                 140


Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145                 150                 155                 160


Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
                165                 170                 175
```

```
Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
            180                 185                 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
        195                 200                 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu
    210                 215                 220

Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr
225                 230                 235                 240

Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro
                245                 250                 255

Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr
            260                 265                 270

Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys
        275                 280                 285

Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser
    290                 295                 300

Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His
305                 310                 315                 320

Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His
                325                 330                 335

Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp
            340                 345                 350

Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
        355                 360                 365

Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
    370                 375                 380

Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
385                 390                 395                 400

Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
                405                 410                 415

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
            420                 425                 430
```

```
Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
        435                 440                 445

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
    450                 455                 460

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
465                 470                 475                 480

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr
                485                 490                 495

Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro
            500                 505                 510

Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro
        515                 520                 525

Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr Glu
    530                 535                 540

His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu
545                 550                 555                 560

Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val Met
                565                 570                 575

Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys Lys
            580                 585                 590

Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser Leu
        595                 600                 605

Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe Gly
    610                 615                 620

Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp Ser
625                 630                 635                 640

Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys
                645                 650                 655

Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys
            660                 665                 670

Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val
        675                 680                 685
```

```
Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile
    690                 695                 700

Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val
705                 710                 715                 720

Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala
                725                 730                 735

Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser
            740                 745                 750

Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala
        755                 760                 765

Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met
    770                 775                 780

Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly
785                 790                 795                 800

Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly
                805                 810                 815

Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr
            820                 825                 830

Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys
        835                 840                 845

Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser
    850                 855                 860

Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr
865                 870                 875                 880

Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val
                885                 890                 895

His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys
            900                 905                 910

Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
        915                 920                 925

Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile
    930                 935                 940
```

```
Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945                 950                 955                 960


Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
                965                 970                 975


Thr Ser Thr Arg Arg
            980
```

<210> 9
<211> 982
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<400> 9

```
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1               5                   10                  15


Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
            20                  25                  30


Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
        35                  40                  45


Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
    50                  55                  60


Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65                  70                  75                  80


Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
                85                  90                  95


Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
            100                 105                 110


Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
        115                 120                 125


Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
    130                 135                 140


Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145                 150                 155                 160


Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
                165                 170                 175
```

```
Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
            180                 185                 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
        195                 200                 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu
    210                 215                 220

Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
225                 230                 235                 240

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
                245                 250                 255

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
            260                 265                 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
        275                 280                 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
    290                 295                 300

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
305                 310                 315                 320

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
                325                 330                 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
            340                 345                 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
        355                 360                 365

Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
    370                 375                 380

Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
385                 390                 395                 400

Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
                405                 410                 415

Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
            420                 425                 430
```

```
Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
        435                 440                 445

Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
    450                 455                 460

Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
465                 470                 475                 480

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
                485                 490                 495

Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
            500                 505                 510

Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu
        515                 520                 525

Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr
    530                 535                 540

Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala
545                 550                 555                 560

Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
                565                 570                 575

Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
            580                 585                 590

Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
        595                 600                 605

Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
    610                 615                 620

Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
625                 630                 635                 640

Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
                645                 650                 655

Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
            660                 665                 670

Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
        675                 680                 685
```

```
Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
    690                 695                 700

Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
705                 710                 715                 720

Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
                725                 730                 735

Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
            740                 745                 750

Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
        755                 760                 765

Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
    770                 775                 780

Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
785                 790                 795                 800

Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
                805                 810                 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
            820                 825                 830

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
        835                 840                 845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
    850                 855                 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865                 870                 875                 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
                885                 890                 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
            900                 905                 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
        915                 920                 925

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
    930                 935                 940
```

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945 950 955 960

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
965 970 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 10
<211> 981
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<400> 10

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala

```
            180                 185                 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
        195                 200                 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu
    210                 215                 220

Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr
225                 230                 235                 240

Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro
                245                 250                 255

Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr
            260                 265                 270

Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys
        275                 280                 285

Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser
    290                 295                 300

Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His
305                 310                 315                 320

Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His
                325                 330                 335

Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp
            340                 345                 350

Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
        355                 360                 365

Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
    370                 375                 380

Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
385                 390                 395                 400

Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
                405                 410                 415

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
            420                 425                 430

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
```

```
        435                 440                 445

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
    450                 455                 460

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
465                 470                 475                 480

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr
                485                 490                 495

Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro
            500                 505                 510

Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro
        515                 520                 525

Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr Glu
    530                 535                 540

His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu
545                 550                 555                 560

Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val Met
                565                 570                 575

Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys Lys
            580                 585                 590

Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser Leu
        595                 600                 605

Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe Gly
    610                 615                 620

Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp Ser
625                 630                 635                 640

Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys
                645                 650                 655

Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys
            660                 665                 670

Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val
        675                 680                 685

Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile
```

690 695 700

Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val
705 710 715 720

Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala
725 730 735

Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser
740 745 750

Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala
755 760 765

Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met
770 775 780

Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly
785 790 795 800

Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly
805 810 815

Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr
820 825 830

Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys
835 840 845

Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser
850 855 860

Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr
865 870 875 880

Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val
885 890 895

His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys
900 905 910

Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
915 920 925

Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile
930 935 940

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser

945 950 955 960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
965 970 975

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 11
<211> 982
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<400> 11

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
180 185 190

```
Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
        195                 200                 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
    210                 215                 220

Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
225                 230                 235                 240

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
                245                 250                 255

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
            260                 265                 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
        275                 280                 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
    290                 295                 300

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
305                 310                 315                 320

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
                325                 330                 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
            340                 345                 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
        355                 360                 365

Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
    370                 375                 380

Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
385                 390                 395                 400

Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
                405                 410                 415

Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
            420                 425                 430

Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
        435                 440                 445
```

```
Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
    450                 455                 460

Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
465                 470                 475                 480

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
                485                 490                 495

Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
            500                 505                 510

Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu
        515                 520                 525

Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr
    530                 535                 540

Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala
545                 550                 555                 560

Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
                565                 570                 575

Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
            580                 585                 590

Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
        595                 600                 605

Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
    610                 615                 620

Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
625                 630                 635                 640

Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
                645                 650                 655

Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
            660                 665                 670

Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
        675                 680                 685

Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
    690                 695                 700
```

```
Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
705                 710                 715                 720

Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
                725                 730                 735

Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
            740                 745                 750

Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
        755                 760                 765

Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
    770                 775                 780

Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
785                 790                 795                 800

Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
                805                 810                 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
            820                 825                 830

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
        835                 840                 845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
    850                 855                 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865                 870                 875                 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
                885                 890                 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
            900                 905                 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
        915                 920                 925

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
    930                 935                 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945                 950                 955                 960
```

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
965 970 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 12
<211> 981
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<400> 12

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
180 185 190

```
Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
        195                 200                 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
    210                 215                 220

Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr
225                 230                 235                 240

Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro
                245                 250                 255

Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr
            260                 265                 270

Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys
        275                 280                 285

Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser
    290                 295                 300

Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His
305                 310                 315                 320

Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His
                325                 330                 335

Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp
            340                 345                 350

Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
        355                 360                 365

Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
    370                 375                 380

Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
385                 390                 395                 400

Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
                405                 410                 415

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
            420                 425                 430

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
        435                 440                 445
```

```
Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
    450                 455                 460

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
465                 470                 475                 480

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr
                485                 490                 495

Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro
            500                 505                 510

Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro
        515                 520                 525

Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr Glu
    530                 535                 540

His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu
545                 550                 555                 560

Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val Met
                565                 570                 575

Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys Lys
            580                 585                 590

Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser Leu
        595                 600                 605

Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe Gly
    610                 615                 620

Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp Ser
625                 630                 635                 640

Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys
                645                 650                 655

Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys
            660                 665                 670

Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val
        675                 680                 685

Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile
    690                 695                 700
```

```
Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val
705                 710                 715                 720

Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala
                725                 730                 735

Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser
            740                 745                 750

Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala
        755                 760                 765

Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met
    770                 775                 780

Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly
785                 790                 795                 800

Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly
                805                 810                 815

Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr
            820                 825                 830

Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys
        835                 840                 845

Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser
    850                 855                 860

Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr
865                 870                 875                 880

Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val
                885                 890                 895

His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys
            900                 905                 910

Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
        915                 920                 925

Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile
    930                 935                 940

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945                 950                 955                 960
```

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
965 970 975

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 13
<211> 982
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<400> 13

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
180 185 190

```
Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
        195                 200                 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
    210                 215                 220

Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
225                 230                 235                 240

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
                245                 250                 255

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
            260                 265                 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
        275                 280                 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
    290                 295                 300

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
305                 310                 315                 320

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
                325                 330                 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
            340                 345                 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
        355                 360                 365

Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
    370                 375                 380

Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
385                 390                 395                 400

Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
                405                 410                 415

Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
            420                 425                 430

Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
        435                 440                 445
```

```
Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
    450                 455                 460

Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
465                 470                 475                 480

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
                485                 490                 495

Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
            500                 505                 510

Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu
        515                 520                 525

Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr
    530                 535                 540

Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala
545                 550                 555                 560

Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
                565                 570                 575

Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
            580                 585                 590

Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
        595                 600                 605

Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
    610                 615                 620

Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
625                 630                 635                 640

Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
                645                 650                 655

Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
            660                 665                 670

Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
        675                 680                 685

Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
    690                 695                 700
```

```
Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
705                 710                 715                 720

Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
                725                 730                 735

Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
            740                 745                 750

Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
        755                 760                 765

Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
    770                 775                 780

Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
785                 790                 795                 800

Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
                805                 810                 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
            820                 825                 830

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
        835                 840                 845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
    850                 855                 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865                 870                 875                 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
                885                 890                 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
            900                 905                 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
        915                 920                 925

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
    930                 935                 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945                 950                 955                 960
```

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
965 970 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 14
<211> 981
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<400> 14

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro

```
        195                 200                 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
    210                 215                 220

Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr
225                 230                 235                 240

Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro
                245                 250                 255

Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr
            260                 265                 270

Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys
        275                 280                 285

Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser
    290                 295                 300

Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His
305                 310                 315                 320

Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His
                325                 330                 335

Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp
            340                 345                 350

Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
        355                 360                 365

Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
    370                 375                 380

Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
385                 390                 395                 400

Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
                405                 410                 415

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
            420                 425                 430

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
        435                 440                 445

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
```

```
    450                 455                 460

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
465                 470                 475                 480

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr
                485                 490                 495

Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro
            500                 505                 510

Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro
        515                 520                 525

Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr Glu
    530                 535                 540

His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu
545                 550                 555                 560

Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val Met
                565                 570                 575

Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys Lys
            580                 585                 590

Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser Leu
        595                 600                 605

Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe Gly
    610                 615                 620

Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp Ser
625                 630                 635                 640

Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys
                645                 650                 655

Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys
            660                 665                 670

Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val
        675                 680                 685

Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile
    690                 695                 700

Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val
```

705 710 715 720

Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala
725 730 735

Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser
740 745 750

Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala
755 760 765

Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met
770 775 780

Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly
785 790 795 800

Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly
805 810 815

Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr
820 825 830

Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys
835 840 845

Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser
850 855 860

Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr
865 870 875 880

Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val
885 890 895

His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys
900 905 910

Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
915 920 925

Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile
930 935 940

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945 950 955 960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu

965 970 975

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 15
<211> 982
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<400> 15

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
195 200 205

```
Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
    210                 215                 220

Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
225                 230                 235                 240

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
                245                 250                 255

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
            260                 265                 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
        275                 280                 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
    290                 295                 300

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
305                 310                 315                 320

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
                325                 330                 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
            340                 345                 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
        355                 360                 365

Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
    370                 375                 380

Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
385                 390                 395                 400

Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
                405                 410                 415

Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
            420                 425                 430

Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
        435                 440                 445

Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
    450                 455                 460
```

```
Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
465                 470                 475                 480

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
                485                 490                 495

Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
            500                 505                 510

Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu
        515                 520                 525

Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr
    530                 535                 540

Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala
545                 550                 555                 560

Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
                565                 570                 575

Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
            580                 585                 590

Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
        595                 600                 605

Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
    610                 615                 620

Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
625                 630                 635                 640

Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
                645                 650                 655

Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
            660                 665                 670

Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
        675                 680                 685

Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
    690                 695                 700

Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
705                 710                 715                 720
```

```
Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
                725                 730                 735

Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
            740                 745                 750

Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
        755                 760                 765

Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
    770                 775                 780

Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
785                 790                 795                 800

Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
                805                 810                 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
            820                 825                 830

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
        835                 840                 845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
    850                 855                 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865                 870                 875                 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
                885                 890                 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
            900                 905                 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
        915                 920                 925

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
    930                 935                 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945                 950                 955                 960

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
                965                 970                 975
```

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 16
<211> 981
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<400> 16

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
195 200 205

```
Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
    210                 215                 220

Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr
225                 230                 235                 240

Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro
                245                 250                 255

Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr
            260                 265                 270

Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys
        275                 280                 285

Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser
    290                 295                 300

Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His
305                 310                 315                 320

Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His
                325                 330                 335

Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp
            340                 345                 350

Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
        355                 360                 365

Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
    370                 375                 380

Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
385                 390                 395                 400

Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
                405                 410                 415

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
            420                 425                 430

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
        435                 440                 445

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
    450                 455                 460
```

```
Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
465                 470                 475                 480

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr
                485                 490                 495

Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro
            500                 505                 510

Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro
        515                 520                 525

Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr Glu
    530                 535                 540

His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu
545                 550                 555                 560

Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val Met
                565                 570                 575

Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys Lys
            580                 585                 590

Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser Leu
        595                 600                 605

Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe Gly
    610                 615                 620

Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp Ser
625                 630                 635                 640

Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys
                645                 650                 655

Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys
            660                 665                 670

Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val
        675                 680                 685

Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile
    690                 695                 700

Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val
705                 710                 715                 720
```

```
Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala
               725                 730                 735

Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser
            740                 745                 750

Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala
        755                 760                 765

Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met
    770                 775                 780

Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly
785                 790                 795                 800

Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly
               805                 810                 815

Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr
            820                 825                 830

Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys
        835                 840                 845

Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser
    850                 855                 860

Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr
865                 870                 875                 880

Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val
               885                 890                 895

His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys
            900                 905                 910

Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
        915                 920                 925

Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile
    930                 935                 940

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945                 950                 955                 960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
               965                 970                 975
```

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 17
<211> 982
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<400> 17

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
195 200 205

```
Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
    210                 215                 220

Glu Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
225                 230                 235                 240

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
                245                 250                 255

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
            260                 265                 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
        275                 280                 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
    290                 295                 300

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
305                 310                 315                 320

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
                325                 330                 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
            340                 345                 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
        355                 360                 365

Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
    370                 375                 380

Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
385                 390                 395                 400

Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
                405                 410                 415

Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
            420                 425                 430

Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
        435                 440                 445

Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
    450                 455                 460
```

```
Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
465                 470                 475                 480

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
                485                 490                 495

Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
            500                 505                 510

Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu
        515                 520                 525

Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr
    530                 535                 540

Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala
545                 550                 555                 560

Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
                565                 570                 575

Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
            580                 585                 590

Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
        595                 600                 605

Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
    610                 615                 620

Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
625                 630                 635                 640

Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
                645                 650                 655

Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
            660                 665                 670

Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
        675                 680                 685

Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
    690                 695                 700

Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
705                 710                 715                 720
```

```
Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
                725                 730                 735

Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
            740                 745                 750

Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
        755                 760                 765

Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
    770                 775                 780

Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
785                 790                 795                 800

Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
                805                 810                 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
            820                 825                 830

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
        835                 840                 845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
    850                 855                 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865                 870                 875                 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
                885                 890                 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
            900                 905                 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
        915                 920                 925

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
    930                 935                 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945                 950                 955                 960

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
                965                 970                 975
```

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 18

<400> 18
000

<210> 19

<400> 19
000

<210> 20
<211> 488
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<400> 20

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
165 170 175

```
Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
            180                 185                 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
        195                 200                 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
    210                 215                 220

Glu Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
225                 230                 235                 240

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
                245                 250                 255

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
            260                 265                 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
        275                 280                 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
    290                 295                 300

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
305                 310                 315                 320

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
                325                 330                 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
            340                 345                 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
        355                 360                 365

Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
    370                 375                 380

Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
385                 390                 395                 400

Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
                405                 410                 415

Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
            420                 425                 430
```

Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
435 440 445

Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
450 455 460

Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
465 470 475 480

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
485

<210> 21
<211> 683
<212> ДНК
<213> Вирус иммунодефицита человека 1 типа

<400> 21
cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60

ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120

aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaaag aaaaggggg 180

actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatatc cttgatctgt ggatctacca 240

cacacaaggc tacttccctg attggcagaa ctacacacca gggccaggga tcagatatcc 300

actgaccttt ggatggtgct acaagctagt accagttgag caagagaagg tagaagaagc 360

caatgaagga gagaacaccc gcttgttaca ccctgtgagc ctgcatggga tggatgaccc 420

ggagagagaa gtattagagt ggaggtttga cagccgccta gcatttcatc acatggcccg 480

agagctgcat ccggactgta ctgggtctct ctggttagac cagatctgag cctgggagct 540

ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgcctt gagtgcttca 600

agtagtgtgt gcccgtctgt tgtgtgactc tggtaactag agatccctca gacccttta 660

gtcagtgtgg aaaatctcta gca 683

<210> 22
<211> 416
<212> ДНК
<213> Вирус иммунодефицита человека 1 типа

<400> 22
cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60

ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120

aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaaag aaaaggggg 180

actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatctg ctttttgcct gtactgggtc 240

tctctggtta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct 300

taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgct tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 360

ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagca 416

<210> 23
<211> 401
<212> ДНК
<213> Вирус иммунодефицита человека 1 типа

<400> 23
cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60

ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120

aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttactgg aagggctaat 180

tcactcccaa cgaagacaag atctgctttt tgcctgtact gggtctctct ggttagacca 240

gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaaccca ctgcttaagc ctcaataaag 300

cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag 360

atccctcaga ccctttttagt cagtgtggaa aatctctagc a 401

<210> 24

<400> 24
000

<210> 25

<400> 25
000

<210> 26
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<400> 26

Arg Ser Lys Arg Ser
1 5

<210> 27
<211> 4
<212> ПРТ
<213> Вирус Синдбис

<400> 27

Arg Ser Lys Arg
1

<210> 28

<400> 28
000

<210> 29

<400> 29
000

<210> 30

<400> 30
000

<210> 31

<400> 31
000

<210> 32

<400> 32
000

<210> 33

<400> 33
000

<210> 34

<400> 34
000

<210> 35
<211> 8
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> тег пептидная последовательность

<400> 35

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 36
<211> 1374
<212> ПРТ
<213> Человеческий герпесвирус 2

<400> 36

Met Ala Ala Pro Ala Arg Asp Pro Pro Gly Tyr Arg Tyr Ala Ala Ala
1 5 10 15

Ile Leu Pro Thr Gly Ser Ile Leu Ser Thr Ile Glu Val Ala Ser His
20 25 30

Arg Arg Leu Phe Asp Phe Phe Ala Ala Val Arg Ser Asp Glu Asn Ser
35 40 45

Leu Tyr Asp Val Glu Phe Asp Ala Leu Leu Gly Ser Tyr Cys Asn Thr
50 55 60

```
Leu Ser Leu Val Arg Phe Leu Glu Leu Gly Leu Ser Val Ala Cys Val
65                  70                  75                  80

Cys Thr Lys Phe Pro Glu Leu Ala Tyr Met Asn Glu Gly Arg Val Gln
                85                  90                  95

Phe Glu Val His Gln Pro Leu Ile Ala Arg Asp Gly Pro His Pro Val
            100                 105                 110

Glu Gln Pro Val His Asn Tyr Met Thr Lys Val Ile Asp Arg Arg Ala
        115                 120                 125

Leu Asn Ala Ala Phe Ser Leu Ala Thr Glu Ala Ile Ala Leu Leu Thr
    130                 135                 140

Gly Glu Ala Leu Asp Gly Thr Gly Ile Ser Leu His Arg Gln Leu Arg
145                 150                 155                 160

Ala Ile Gln Gln Leu Ala Arg Asn Val Gln Ala Val Leu Gly Ala Phe
                165                 170                 175

Glu Arg Gly Thr Ala Asp Gln Met Leu His Val Leu Leu Glu Lys Ala
            180                 185                 190

Pro Pro Leu Ala Leu Leu Leu Pro Met Gln Arg Tyr Leu Asp Asn Gly
        195                 200                 205

Arg Leu Ala Thr Arg Val Ala Arg Ala Thr Leu Val Ala Glu Leu Lys
    210                 215                 220

Arg Ser Phe Cys Asp Thr Ser Phe Phe Leu Gly Lys Ala Gly His Arg
225                 230                 235                 240

Arg Glu Ala Ile Glu Ala Trp Leu Val Asp Leu Thr Thr Ala Thr Gln
                245                 250                 255

Pro Ser Val Ala Val Pro Arg Leu Thr His Ala Asp Thr Arg Gly Arg
            260                 265                 270

Pro Val Asp Gly Val Leu Val Thr Thr Ala Ala Ile Lys Gln Arg Leu
        275                 280                 285

Leu Gln Ser Phe Leu Lys Val Glu Asp Thr Glu Ala Asp Val Pro Val
    290                 295                 300

Thr Tyr Gly Glu Met Val Leu Asn Gly Ala Asn Leu Val Thr Ala Leu
305                 310                 315                 320
```

```
Val Met Gly Lys Ala Val Arg Ser Leu Asp Asp Val Gly Arg His Leu
                325                 330                 335

Leu Asp Met Gln Glu Glu Gln Leu Glu Ala Asn Arg Glu Thr Leu Asp
            340                 345                 350

Glu Leu Glu Ser Ala Pro Gln Thr Thr Arg Val Arg Ala Asp Leu Val
        355                 360                 365

Ala Ile Gly Asp Arg Leu Val Phe Leu Glu Ala Leu Glu Arg Arg Ile
    370                 375                 380

Tyr Ala Ala Thr Asn Val Pro Tyr Pro Leu Val Gly Ala Met Asp Leu
385                 390                 395                 400

Thr Phe Val Leu Pro Leu Gly Leu Phe Asn Pro Ala Met Glu Arg Phe
                405                 410                 415

Ala Ala His Ala Gly Asp Leu Val Pro Ala Pro Gly His Pro Glu Pro
            420                 425                 430

Arg Ala Phe Pro Pro Arg Gln Leu Phe Phe Trp Gly Lys Asp His Gln
        435                 440                 445

Val Leu Arg Leu Ser Met Glu Asn Ala Val Gly Thr Val Cys His Pro
    450                 455                 460

Ser Leu Met Asn Ile Asp Ala Ala Val Gly Gly Val Asn His Asp Pro
465                 470                 475                 480

Val Glu Ala Ala Asn Pro Tyr Gly Ala Tyr Val Ala Ala Pro Ala Gly
                485                 490                 495

Pro Gly Ala Asp Met Gln Gln Arg Phe Leu Asn Ala Trp Arg Gln Arg
            500                 505                 510

Leu Ala His Gly Arg Val Arg Trp Val Ala Glu Cys Gln Met Thr Ala
        515                 520                 525

Glu Gln Phe Met Gln Pro Asp Asn Ala Asn Leu Ala Leu Glu Leu His
    530                 535                 540

Pro Ala Phe Asp Phe Phe Ala Gly Val Ala Asp Val Glu Leu Pro Gly
545                 550                 555                 560

Gly Glu Val Pro Pro Ala Gly Pro Gly Ala Ile Gln Ala Thr Trp Arg
                565                 570                 575
```

```
Val Val Asn Gly Asn Leu Pro Leu Ala Leu Cys Pro Val Ala Phe Arg
            580                 585                 590

Asp Ala Arg Gly Leu Glu Leu Gly Val Gly Arg His Ala Met Ala Pro
        595                 600                 605

Ala Thr Ile Ala Ala Val Arg Gly Ala Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Pro
    610                 615                 620

Ala Val Phe Tyr Leu Leu Gln Ala Ala Ile His Gly Asn Glu His Val
625                 630                 635                 640

Phe Cys Ala Leu Ala Arg Leu Val Thr Gln Cys Ile Thr Ser Tyr Trp
                645                 650                 655

Asn Asn Thr Arg Cys Ala Ala Phe Val Asn Asp Tyr Ser Leu Val Ser
            660                 665                 670

Tyr Ile Val Thr Tyr Leu Gly Gly Asp Leu Pro Glu Glu Cys Met Ala
        675                 680                 685

Val Tyr Arg Asp Leu Val Ala His Val Glu Ala Leu Ala Gln Leu Val
    690                 695                 700

Asp Asp Phe Thr Leu Pro Gly Pro Glu Leu Gly Gly Gln Ala Gln Ala
705                 710                 715                 720

Glu Leu Asn His Leu Met Arg Asp Pro Ala Leu Leu Pro Pro Leu Val
                725                 730                 735

Trp Asp Cys Asp Gly Leu Met Arg His Ala Ala Leu Asp Arg His Arg
            740                 745                 750

Asp Cys Arg Ile Asp Ala Gly Gly His Glu Pro Val Tyr Ala Ala Ala
        755                 760                 765

Cys Asn Val Ala Thr Ala Asp Phe Asn Arg Asn Asp Gly Arg Leu Leu
    770                 775                 780

His Asn Thr Gln Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp Asp Arg Pro His
785                 790                 795                 800

Arg Pro Ala Asp Trp Thr Val His His Lys Ile Tyr Tyr Tyr Val Leu
                805                 810                 815

Val Pro Ala Phe Ser Arg Gly Arg Cys Cys Thr Ala Gly Val Arg Phe
            820                 825                 830
```

```
Asp Arg Val Tyr Ala Thr Leu Gln Asn Met Val Val Pro Glu Ile Ala
        835                 840                 845

Pro Gly Glu Glu Cys Pro Ser Asp Pro Val Thr Asp Pro Ala His Pro
    850                 855                 860

Leu His Pro Ala Asn Leu Val Ala Asn Thr Val Lys Arg Met Phe His
865                 870                 875                 880

Asn Gly Arg Val Val Val Asp Gly Pro Ala Met Leu Thr Leu Gln Val
                885                 890                 895

Leu Ala His Asn Met Ala Glu Arg Thr Thr Ala Leu Leu Cys Ser Ala
            900                 905                 910

Ala Pro Asp Ala Gly Ala Asn Thr Ala Ser Thr Ala Asn Met Arg Ile
        915                 920                 925

Phe Asp Gly Ala Leu His Ala Gly Val Leu Leu Met Ala Pro Gln His
    930                 935                 940

Leu Asp His Thr Ile Gln Asn Gly Glu Tyr Phe Tyr Val Leu Pro Val
945                 950                 955                 960

His Ala Leu Phe Ala Gly Ala Asp His Val Ala Asn Ala Pro Asn Phe
                965                 970                 975

Pro Pro Ala Leu Arg Asp Leu Ala Arg Asp Val Pro Leu Val Pro Pro
            980                 985                 990

Ala Leu Gly Ala Asn Tyr Phe Ser  Ser Ile Arg Gln Pro  Val Val Gln
        995                 1000                1005

His Ala  Arg Glu Ser Ala Ala  Gly Glu Asn Ala Leu  Thr Tyr Ala
    1010                1015                1020

Leu Met  Ala Gly Tyr Phe Lys  Met Ser Pro Val Ala  Leu Tyr His
    1025                1030                1035

Gln Leu  Lys Thr Gly Leu His  Pro Gly Phe Gly Phe  Thr Val Val
    1040                1045                1050

Arg Gln  Asp Arg Phe Val Thr  Glu Asn Val Leu Phe  Ser Glu Arg
    1055                1060                1065

Ala Ser  Glu Ala Tyr Phe Leu  Gly Gln Leu Gln Val  Ala Arg His
    1070                1075                1080
```

```
Glu Thr  Gly Gly Gly Val Asn  Phe Thr Leu Thr Gln  Pro Arg Gly
    1085                1090                1095

Asn Val  Asp Leu Gly Val Gly  Tyr Thr Ala Val Ala  Ala Thr Gly
    1100                1105                1110

Thr Val  Arg Asn Pro Val Thr  Asp Met Gly Asn Leu  Pro Gln Asn
    1115                1120                1125

Phe Tyr  Leu Gly Arg Gly Ala  Pro Pro Leu Leu Asp  Asn Ala Ala
    1130                1135                1140

Ala Val  Tyr Leu Arg Asn Ala  Val Val Ala Gly Asn  Arg Leu Gly
    1145                1150                1155

Pro Ala  Gln Pro Leu Pro Val  Phe Gly Cys Ala Gln  Val Pro Arg
    1160                1165                1170

Arg Ala  Gly Met Asp His Gly  Gln Asp Ala Val Cys  Glu Phe Ile
    1175                1180                1185

Ala Thr  Pro Val Ala Thr Asp  Ile Asn Tyr Phe Arg  Arg Pro Cys
    1190                1195                1200

Asn Pro  Arg Gly Arg Ala Ala  Gly Gly Val Tyr Ala  Gly Asp Lys
    1205                1210                1215

Glu Gly  Asp Val Ile Ala Leu  Met Tyr Asp His Gly  Gln Ser Asp
    1220                1225                1230

Pro Ala  Arg Pro Phe Ala Ala  Thr Ala Asn Pro Trp  Ala Ser Gln
    1235                1240                1245

Arg Phe  Ser Tyr Gly Asp Leu  Leu Tyr Asn Gly Ala  Tyr His Leu
    1250                1255                1260

Asn Gly  Ala Ser Pro Val Leu  Ser Pro Cys Phe Lys  Phe Phe Thr
    1265                1270                1275

Ala Ala  Asp Ile Thr Ala Lys  His Arg Cys Leu Glu  Arg Leu Ile
    1280                1285                1290

Val Glu  Thr Gly Ser Ala Val  Ser Thr Ala Thr Ala  Ala Ser Asp
    1295                1300                1305

Val Gln  Phe Lys Arg Pro Pro  Gly Cys Arg Glu Leu  Val Glu Asp
    1310                1315                1320
```

Pro Cys Gly Leu Phe Gln Glu Ala Tyr Pro Ile Thr Cys Ala Ser
1325 1330 1335

Asp Pro Ala Leu Leu Arg Ser Ala Arg Asp Gly Glu Ala His Ala
1340 1345 1350

Arg Glu Thr His Phe Thr Gln Tyr Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Pro
1355 1360 1365

Leu Lys Gly Leu Ser Leu
1370

<210> 37
<211> 15
<212> ПРТ
<213> Человеческий герпесвирус 2

<400> 37

Asn Tyr Phe Ser Ser Ile Arg Gln Pro Val Val Gln His Ala Arg
1 5 10 15

<210> 38
<211> 15
<212> ПРТ
<213> Человеческий герпесвирус 2

<400> 38

Cys Glu Phe Ile Ala Thr Pro Val Ala Thr Asp Ile Asn Tyr Phe
1 5 10 15

<210> 39
<211> 15
<212> ПРТ
<213> Человеческий герпесвирус 2

<400> 39

Glu Asn Ala Leu Thr Tyr Ala Leu Met Ala Gly Tyr Phe Lys Met
1 5 10 15

<210> 40
<211> 15
<212> ПРТ
<213> Человеческий герпесвирус 2

<400> 40

His Pro Gly Phe Gly Phe Thr Val Val Arg Gln Asp Arg Phe Val
1 5 10 15

<210> 41
<211> 8

<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> тег пептидная последовательность

<400> 41

Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 42
<211> 45
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический полипептид

<400> 42

Gly Pro Lys Glu Pro Phe Gln Ser Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Ser
1 5 10 15

Leu Arg Ala Glu Gln Thr Asp Ala Ala Val Lys Asn Trp Met Thr Gln
20 25 30

Thr Leu Leu Ile Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Leu
35 40 45

<210> 43
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептид

<400> 43

Ala Ala Val Lys Asn Trp Met Thr Gln Thr Leu
1 5 10

<210> 44
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептид

<400> 44

Lys Ser Leu Tyr Asn Thr Val Cys Val
1 5

<210> 45
<211> 13

<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептид

<400> 45

Asp Arg Phe Tyr Lys Ser Leu Arg Ala Glu Gln Thr Asp
1 5 10

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая

a) первую композицию, содержащую векторную частицу, причем векторная частица включает рекомбинантный экспрессионный вектор, при этом рекомбинантный экспрессионный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий антиген, ассоциированный с раком, и, при этом полинуклеотид функционально связан по меньшей мере с одной последовательностью, регулирующей экспрессию, вследствие чего у субъекта индуцируется иммунный ответ, направленный против антигена, ассоциированного с раком; и

b) вторую композицию, содержащую агонист TLR4, причем вторая композиция не содержит антиген;

при этом и первая композиция, и вторая композиция дополнительно содержат фармацевтически приемлемое вспомагательное вещество, для применения в способе лечения рака, при этом первую композицию вводят субъекту системно; при этом вторую композицию вводят субъекту внутриопухолево, перитуморально, интранодально или внутрипузырно; и при этом первую композицию и вторую композицию вводят одновременно или последовательно.

2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что антиген, ассоциированный с раком, выбирается из CTA, NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10, GAGE, PRAME; BAGE; RAGE, SAGE, HAGE, MPHOSPH1, DEPDC1, IMP3 MAGE-A, T-антигена ВК, p53, Ras, c-Myc, A-Raf, B-Raf, C-Raf, циклин-зависимых киназ, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSA, PSM, тирозиназы, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, фосфоинозитидных 3-киназ (PI3K), рецепторов TRK, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, антигена опухоли Вильмса (WT1), AFP, β-катенина/m, каспазы-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, миозина/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, аннексина II, CDC27/m, TPI/mbcr-abl, BCR-ABL, регуляторного фактора

интерферона 4 (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RARα, опухолеассоциированного преобразователя сигнала кальция 1 (TACSTD1) TACSTD2, рецепторных тирозинкиназ, рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), EGFRvIII, рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGFR), рецептора фактора роста сосудистого эндотелия (VEGFR), цитоплазматических тирозинкиназ, src-семейства, syk-ZAP70, интегрин-связанной киназы (ILK), преобразователей сигналов и активаторов транскрипции STAT3, STAT5 и STAT6, факторов, индуцируемых гипоксией, HIF-1α и HIF-2α, ядерного фактора-каппа в (NF-κB), рецепторов Notch, Notch1-4, c-Met, мишеней рапамицина у млекопитающих (mTOR), WNT, киназ, регулируемых внеклеточными сигналами (ERK), PMSA, PR-3, MDM2, мезотелина, раковых клеток почек - 5T4, SM22-альфа, карбоангидраз I (CAI) и IX (CAIX), STEAD, TEL/AML1, GD2, протеиназы 3, hTERT, контрольных точек транслокации саркомы, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (слитый ген TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, андрогенового рецептора, циклина B1, полисиаловой кислоты, MYCN, RhoC, GD3, фукозила GM1, мезотелиана, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboH, NY-BR-1, RGs5, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, белка спермы 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, легумаина, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2 и fos-связанного антигена 1.

3. Композиция по любому из пп. 1-2, отличающаяся тем, что первую композицию вводят системно при помощи первого пути, выбранного из группы, состоящей из внутримышечного, внутрикожного или подкожного пути.

4. Композиция по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что агонист TLR4 представляет собой адъювант, связанный с нетоксичным липидом A.

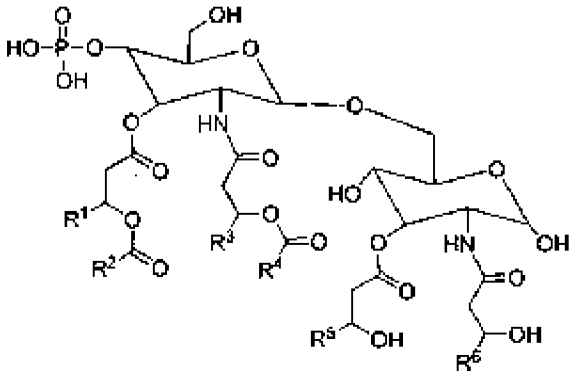
5. Композиция по п. 4, отличающаяся тем, что адъювант, связанный с нетоксичным липидом A, представляет собой глюкопиранозил липид A (GLA).

6. Композиция по п. 5, отличающаяся тем, что GLA готовится в виде стабильной эмульсии типа масло в воде.

7. Композиция по любому из пп. 4-5, отличающаяся тем, что

GLA имеет формулу:

(I)

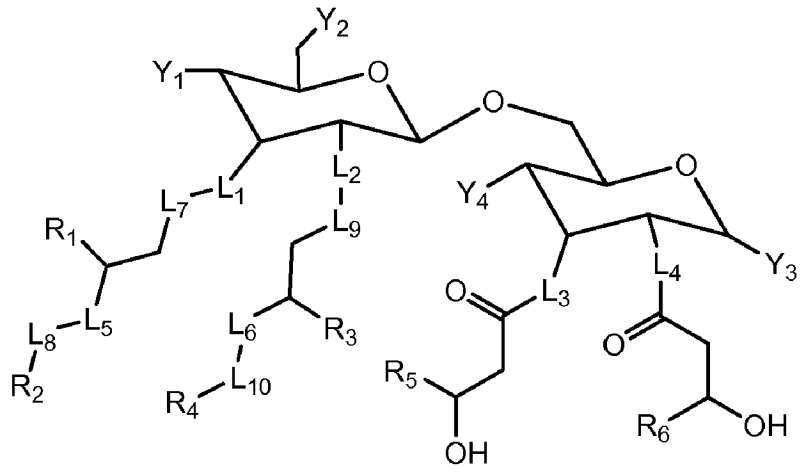


где: R^1, R^3, R^5 и R^6 представляют собой алкил C_{11}-C_{20}; а R^2 и R^4 представляют собой алкил C_{12}-C_{20}.

8. Композиция по п. 7, отличающаяся тем, что R^1, R^3, R^5 и R^6 равны ундецилу, а R^2 и R^4 равны тридецилу.

9. Композиция по любому из пп. 4-5, отличающаяся тем, что GLA имеет формулу:

(II)



или его фармацевтически приемлемая соль, где: L1, L2, L3, L4, L5 и L6 являются одинаковыми или отличающимися и независимо выбранными из -O-, -NH- и - (CH2) -; L7, L8, L9 и L10 являются одинаковыми или отличающимися, и при любом проявлении могут быть либо отсутствующими, либо -C(=O)-; Y1 представляет собой кислотную функциональную группу; Y2 и Y3 являются одинаковыми или отличающимися, и каждый независимо выбран из -OH, -SH и кислотной функциональной группы; Y4 представляет собой -OH или -SH; R1, R3, R5 и R6 являются одинаковыми или отличающимися, и каждый независимо выбран из группы, включающей алкил C8-C13; и

R2 и R4 являются одинаковыми или отличающимися, и каждый независимо выбран из группы, включающей алкил C6-C11.

10. Композиция по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что первую композицию вводят до введения второй композиции.

11. Композиция по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что первую композицию и/или вторую композицию вводят 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз.

12. Композиция по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что рекомбинантный экспрессионный вектор выбирается из ретровирусного векторного генома, лентивирусного векторного генома, поксвирусного векторного генома, векторного генома вируса осповакцины, аденовирусного векторного генома, векторного генома вируса, ассоциированного с аденовирусом, герпесвирусного векторного генома, альфа-вирусного векторного генома, плазмидной ДНК и РНК.

13. Композиция по п. 12, отличающаяся тем, что векторная частица представляет собой лентивирусную векторную частицу, которая содержит лентивирусный векторный геном; поксвирусную векторную частицу, которая содержит поксвирусный векторный геном; векторную частицу вируса осповакцины, которая содержит геном вируса осповакцины; аденовирусную векторную частицу, которая содержит аденовирусный векторный геном; векторную частицу вируса, ассоциированного с аденовирусом, которая содержит векторный геном вируса, ассоциированного с аденовирусом; герпесвирусную векторную частицу, которая содержит герпесвирусный векторный геном; или альфа-вирусную векторную частицу, которая содержит альфа-вирусный векторный геном.

14. Композиция по п. 13, отличающаяся тем, что векторная частица представляет собой лентивирусную векторную частицу и содержит лентивирусный векторный геном.

15. Композиция по п. 13 или 14, отличающаяся тем, что лентивирусная векторная частица дополнительно содержит оболочку, содержащую гликопротеин E2 вируса Синдбис, имеющего по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с SEQ ID NO:1, причем остаток 160 либо отсутствует, либо аминокислота не является глутаминовой кислотой, и при этом гликопротеид E2 не

является частью слитого белка с белком E3 вируса Синдбис.

16. Композиция по п. 15, отличающаяся тем, что лентивирусная векторная частица доставляет рекомбинантный экспрессионный вектор к дендритной клетке.

17. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что рак представляет собой рак, индуцированный онкогенным вирусом.

18. Композиция по п. 17, отличающаяся тем, что антиген, ассоциированный с раком, представляет собой антиген, полученный из онкогенного вируса.

19. Композиция по любому из пп. 1-18, отличающаяся тем, что вторая композиция вводится в комбинации с композицией, содержащей терапевтический агент, выбранный из группы, состоящей из ингибитора контрольной точки, цитокина, хлорохина, антитела, которое увеличивает ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity - антителозависимая клеточно-обусловленная цитотоксичность (АЗКЦ)), антитела, которое активирует костимуляторный сигнал, и антитела анти-CD40.

20. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что первая композиция дополнительно содержит адъювант.

21. Композиция по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающая введение бустерной композиции, содержащей адъювант в комбинации с полипептидом, при этом полипептид содержит антиген, ассоциированный с раком, или его иммуногенный фрагмент.

22. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что индуцированный иммунный ответ включает иммунный ответ цитотоксических Т-лимфоцитов.

23. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что введение второй композиции индуцирует увеличение количества CD8+ Т-клеток в месте введения.

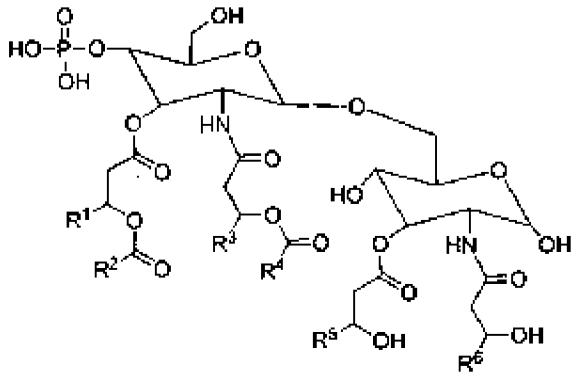
24. Набор, содержащий первую композицию и вторую композицию согласно любому из предшествующих пунктов.

25. Композиция, содержащая:

а) первую композицию, содержащую лентивирусную векторную

частицу, причем лентивирусная векторная частица содержит рекомбинантный экспрессионный вектор, при этом рекомбинантный экспрессионный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий иммуноген, ассоциированный с раком, при этом полинуклеотид функционально связан по меньшей мере с одной регулирующей экспрессию последовательностью; при этом лентивирусная векторная частица дополнительно содержит оболочку, содержащую гликопротеин E2 вируса Синдбис, имеющий по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с SEQ ID NO:1, при этом остаток 160 либо отсутствует, либо аминокислота не является глутаминовой кислотой, и при этом гликопротеид E2 не является частью слитого белка с белком E3 вируса Синдбис; и

b) вторую композицию, содержащую агонист TLR4, при этом вторая композиция не содержит иммуноген, при этом агонист TLR4 представляет собой глюкопиранозил липид A (GLA), приготовленный в стабильной эмульсии типа масло в воде, при этом GLA имеет формулу:



где: R^1, R^3, R^5 и R^6 равны ундецилу, а R^2 и R^4 равны тридецилу;

при этом как первая композиция, так и вторая композиция дополнительно содержат фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество,

для применения в способе лечения рака у субъекта, при этом первая композиция вводится субъекту внутримышечно, внутрикожно или подкожно и индуцирует у субъекта иммунный ответ, специфический для иммуногена, ассоциированного с раком, при этом вторая композиция вводится субъекту внутриопухолево или перитуморально; и при этом первую композицию и вторую композицию вводят одновременно или последовательно.

26. Композиция, содержащая:

a) первую композицию, содержащую

i) антиген-специфические Т-клетки, специфические для антигена, ассоциированного с раком, при этом указанные антиген-специфические Т-клетки увеличены в количестве *ex vivo*,

ii) Т-клетки, которые были генетически модифицированы для экспрессии химерного рецептора антигена (CAR), распознающего антиген, ассоциированный с раком, или

iii) Т-клетки, которые были генетически модифицированы для экспрессии специфического химерного Т-клеточного рецептора (TCR), распознающего антиген, ассоциированный с раком, в контексте MHC; и

b) вторую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый адъювант; при этом вторая композиция не содержит иммуноген;

при этом как первая композиция, так и вторая композиция дополнительно содержат фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество;

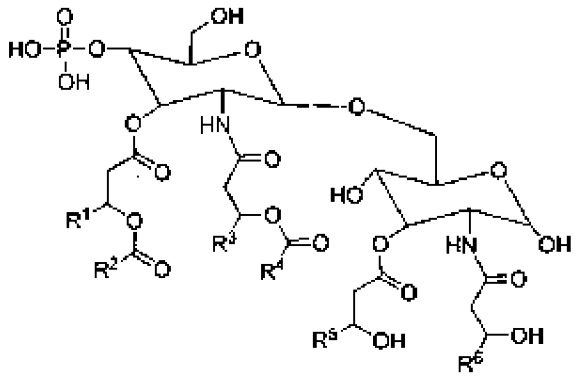
для применения в способе лечения рака, при этом первую композицию вводят субъекту системно, а вторую композицию вводят субъекту внутриопухолево; и при этом первую композицию и вторую композицию вводят одновременно или последовательно.

27. Композиция по п. 26, отличающаяся тем, что адъювант представляет собой адъювант, связанный с нетоксичным липидом A.

28. Композиция по п. 26, отличающаяся тем, что адъювант представляет собой глюкопиранозил липид A (GLA).

29. Композиция по п. 28, отличающаяся тем, что GLA готовится в виде стабильной эмульсии типа масло в воде.

30. Композиция по п. 28 или п. 29, отличающаяся тем, что GLA имеет формулу:



где: R^1, R^3, R^5 и R^6 представляют собой алкил C_{11}-C_{20}; а R^2 и R^4 представляют собой алкил C_{12}-C_{20}.

31. Композиция по п. 30, отличающаяся тем, что R^1, R^3, R^5 и R^6 равны ундецилу, а R^2 и R^4 равны тридецилу.

32. Композиция, содержащая:

a) первую композицию, содержащую векторную частицу, причем векторная частица включает рекомбинантный экспрессионный вектор, при этом рекомбинантный экспрессионный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий антиген, ассоциированный с раком, и при этом полинуклеотид функционально связан по меньшей мере с одной последовательностью, регулирующей экспрессию, и

b) вторую композицию, содержащую агонист TLR4, при этом композиция не содержит антиген;

при этом как первая композиция, так и вторая композиция дополнительно содержат фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, для применения в способе увеличения количества Т-клеток в опухолевом микроокружении у субъекта, при этом первую композицию вводят субъекту системно, тем самым индуцируя у субъекта иммунный ответ, направленный против антигена, ассоциированного с раком; при этом вторую композицию вводят субъекту внутриопухолево или перитуморально; и при этом первую композицию и вторую композицию вводят одновременно или последовательно; тем самым увеличивая количество Т-клеток в опухолевом микроокружении.

33. Композиция по п. 32, отличающаяся тем, что векторная частица представляет собой лентивирусную векторную частицу, которая содержит лентивирусный векторный геном; поксвирусную векторную частицу, которая содержит поксвирусный векторный

геном; векторную частицу вируса осповакцины, которая содержит геном вируса осповакцины; аденовирусную векторную частицу, которая содержит аденовирусный векторный геном; векторную частицу вируса, ассоциированного с аденовирусом, которая содержит векторный геном вируса, ассоциированного с аденовирусом; герпесвирусную векторную частицу, которая содержит герпесвирусный векторный геном; или альфа-вирусную векторную частицу, которая содержит альфа-вирусный векторный геном.

34. Композиция по п. 33, отличающаяся тем, что векторная частица представляет собой лентивирусную векторную частицу и содержит лентивирусный векторный геном.

35. Композиция по пп. 33 или 34, отличающаяся тем, что лентивирусная векторная частица дополнительно содержит оболочку, содержащую гликопротеин E2 вируса Синдбис, имеющего по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с SEQ ID NO:1, при этом остаток 160 либо отсутствует, либо аминокислота не является глутаминовой кислотой, и при этом гликопротеид E2 не является частью слитого белка с белком E3 вируса Синдбис.

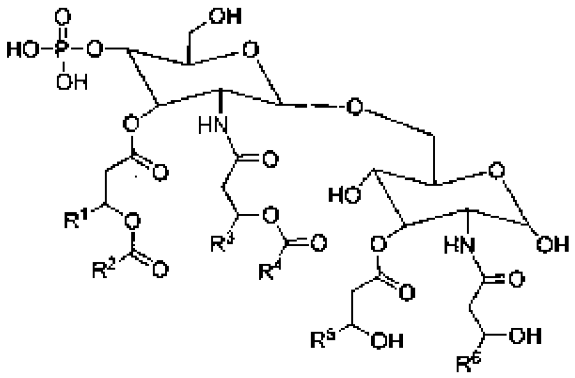
36. Композиция по п. 35, отличающаяся тем, что лентивирусная векторная частица доставляет рекомбинантный экспрессионный вектор к дендритной клетке.

37. Композиция по п. 32, отличающаяся тем, что агонист TLR4 представляет собой адъювант, связанный с нетоксичным липидом A.

38. Композиция по п. 32, отличающаяся тем, что агонист TLR4 представляет собой глюкопиранозил липид A (GLA).

39. Композиция по п. 38, отличающаяся тем, что GLA готовится в виде стабильной эмульсии типа масло в воде.

40. Композиция по п. 38 или п. 39, отличающаяся тем, что GLA имеет формулу:



где: R^1, R^3, R^5 и R^6 представляют собой алкил C_{11}-C_{20}; а R^2 и R^4 представляют собой алкил C_{12}-C_{20}.

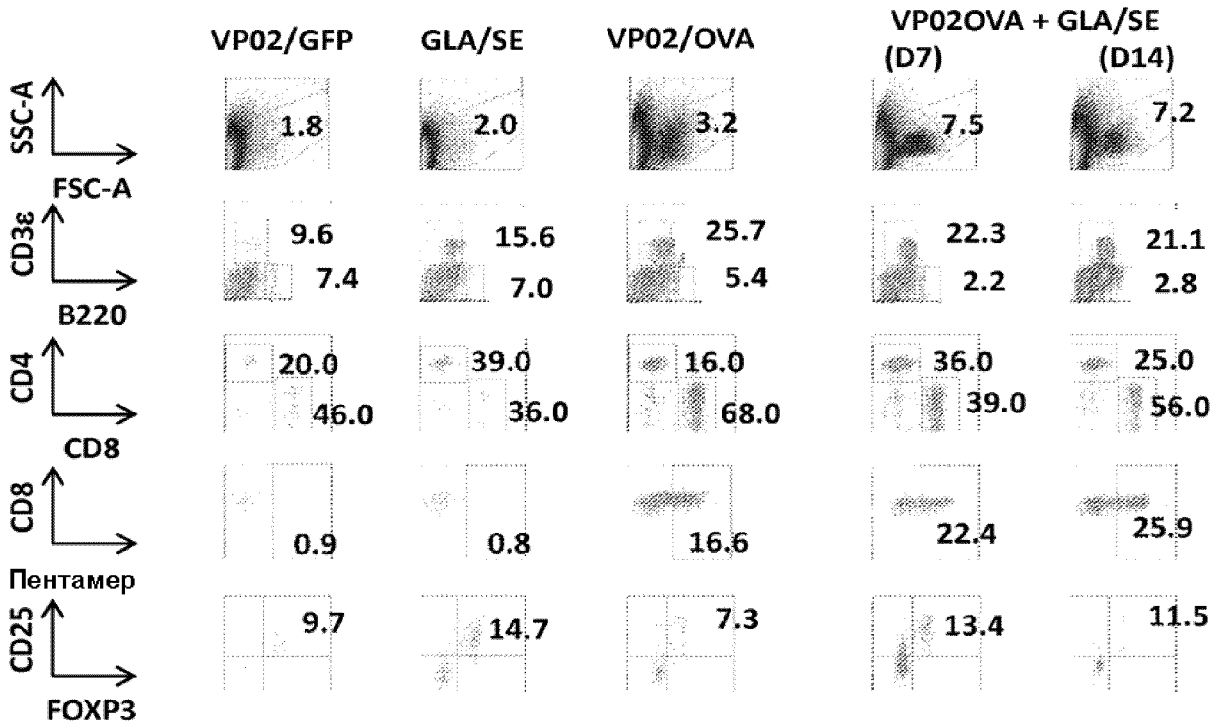
41. Композиция по п. 40, отличающаяся тем, что R^1, R^3, R^5 и R^6 равны ундецилу, а R^2 и R^4 равны тридецилу.

По доверенности

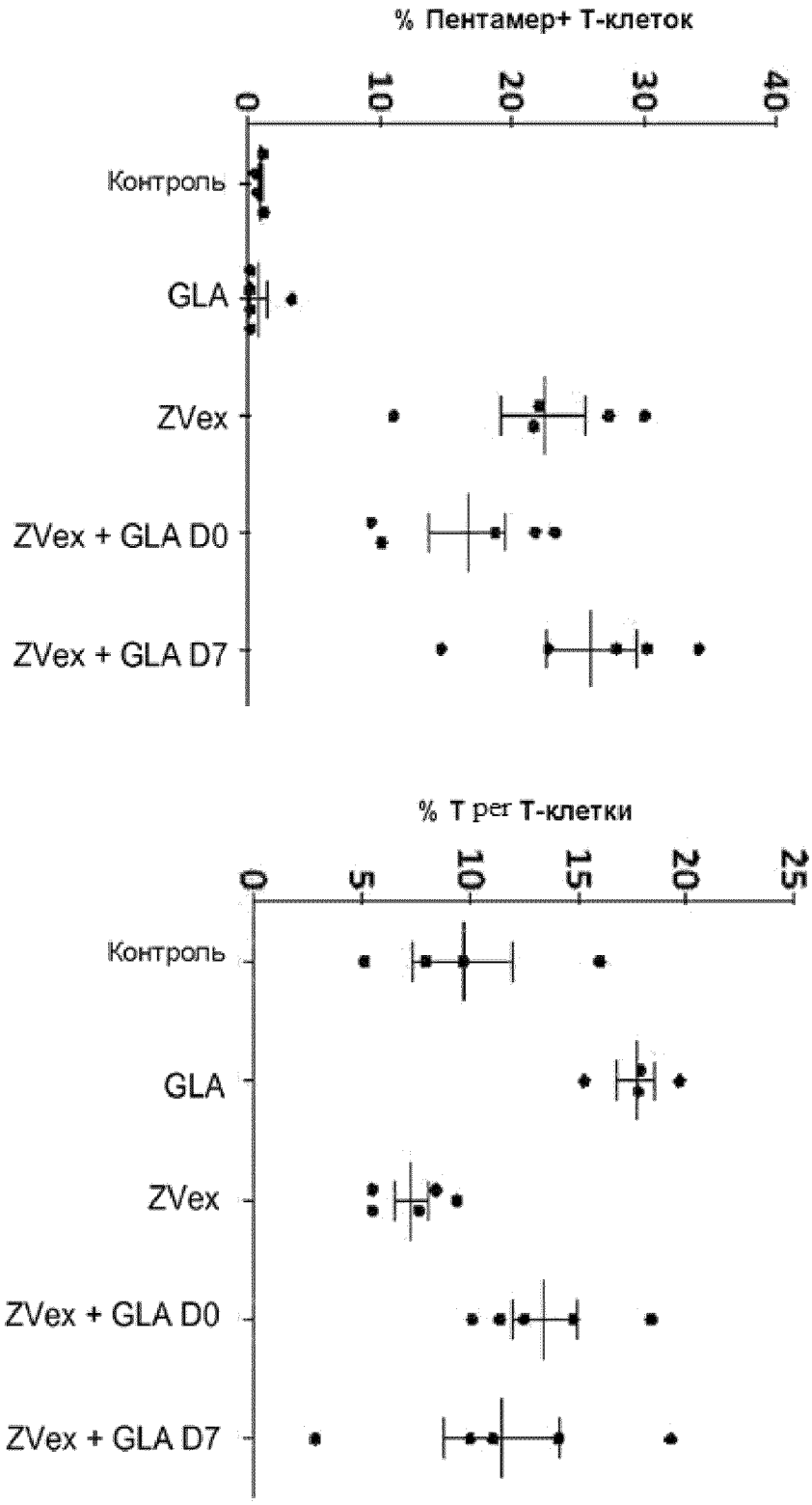
ФИГ. 1A

	Д+0	Д+1	Д+2
VP02/GFP+ GLA (A)	0.5	0.4	0.5
VP02/OVA + GLA (B)	1.9	2.7	3.4
Отношение (B/A)	3.8	6.8	6.8

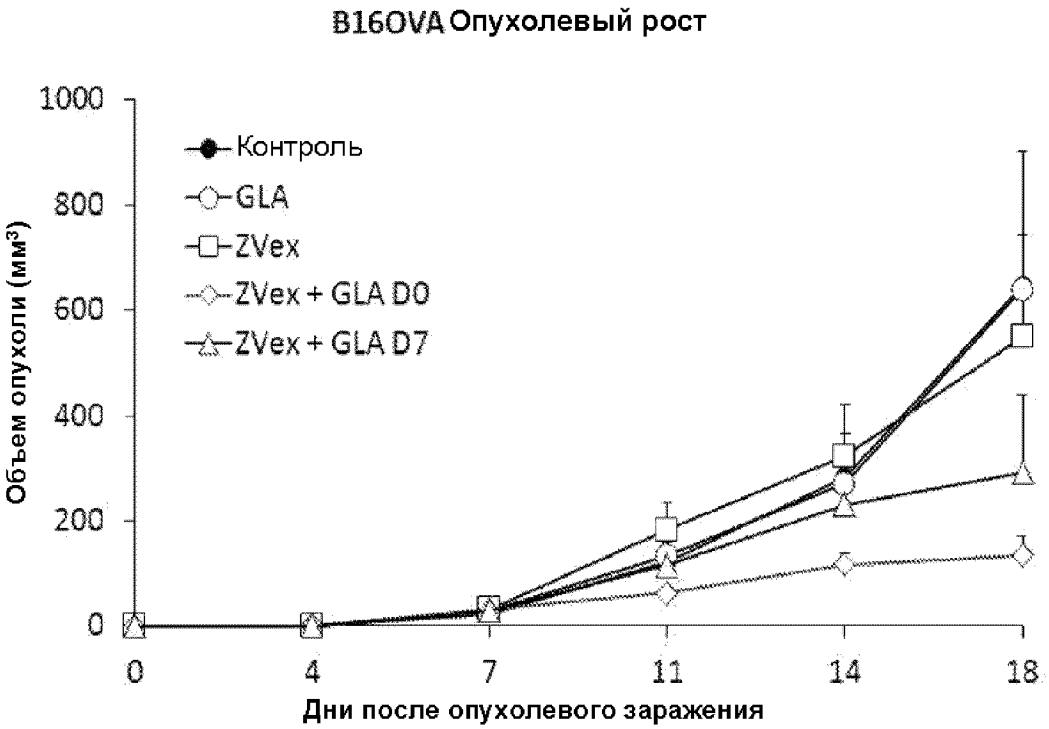
ФИГ. 1B


VP02/GFP
GLA/SE
VP02/OVA
VP02OVA + GLA/SE
(D7)
(D14)
SSC-A
FSC-A
1.8
2.0
3.2
7.5
7.2
CD3ε
B220
9.6
7.4
15.6
7.0
25.7
5.4
22.3
2.2
21.1
2.8
CD4
CD8
20.0
46.0
39.0
36.0
16.0
68.0
36.0
39.0
25.0
56.0
CD8
Пентамер
0.9
0.8
16.6
22.4
25.9
CD25
FOXP3
9.7
14.7
7.3
13.4
11.5

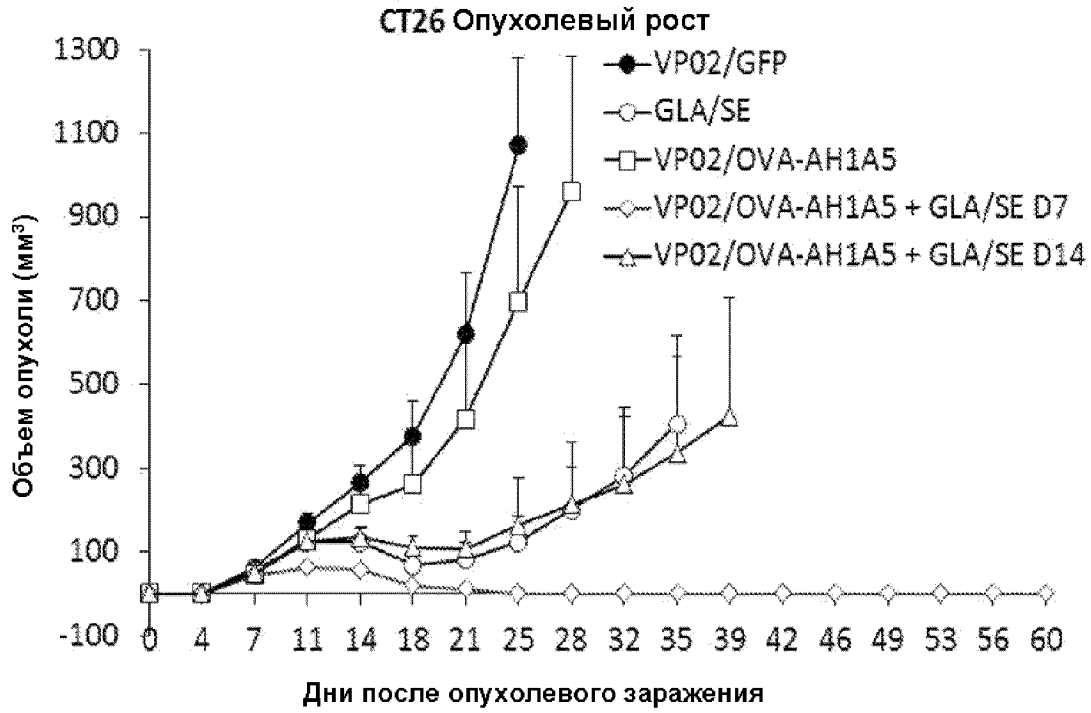
ФИГ. 2А


% Пентамер+ Т-клеток
0
10
20
30
40
Контроль
GLA
ZVex
ZVex + GLA D0
ZVex + GLA D7
% T per Т-клетки
0
5
10
15
20
25
Контроль
GLA
ZVex
ZVex + GLA D0
ZVex + GLA D7

ФИГ. 2B


B16OVA Опухолевый рост
Объем опухоли (мм³)
1000
800
600
400
200
0
Контроль
GLA
ZVex
ZVex + GLA D0
ZVex + GLA D7
0
4
7
11
14
18
Дни после опухолевого заражения

ФИГ. 3A


CT26 Опухолевый рост
Объем опухоли (мм³)
1300
1100
900
700
500
300
100
-100
VP02/GFP
GLA/SE
VP02/OVA-AH1A5
VP02/OVA-AH1A5 + GLA/SE D7
VP02/OVA-AH1A5 + GLA/SE D14
0 4 7 11 14 18 21 25 28 32 35 39 42 46 49 53 56 60
Дни после опухолевого заражения

ФИГ. 3B