

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090548** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.23

(51) Int. Cl. *C07K 14/005* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

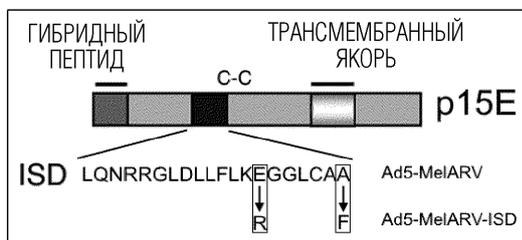
(22) Дата подачи заявки
2018.08.30

**(54) ВАКЦИНА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ПРОФИЛАКТИКЕ И/ИЛИ ЛЕЧЕНИИ
ЗАБОЛЕВАНИЯ**

(31) PA 2017 70659
(32) 2017.09.01
(33) DK
(86) PCT/EP2018/073404
(87) WO 2019/043127 2019.03.07
(71) Заявитель:
ИНПРОТЕР АПС (DK)

(72) Изобретатель:
**Холст Петер (DK), Тирион Кристиан,
Нойкирх Лассе (DE)**
(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к аденовирусному вектору, способному кодировать вирусоподобную частицу (VLP), где указанная VLP презентует неактивный иммуносупрессорный домен (ISD). Вакцина согласно изобретению дает повышенный иммунный ответ посредством любого из путей развития ответа, инициированных CD4-T-клетками или CD8-T-клетками.



A1

202090548

202090548

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-561774EA/022

ВАКЦИНА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ПРОФИЛАКТИКЕ И/ИЛИ ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Область техники

Настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении заболевания. Следует отметить, что заболевание, то есть, такое как рак, может быть вызвано эндогенным ретровирусом. Вакцина согласно изобретению, в частности, относится к вирусам, способным образовывать вирусоподобные частицы в эукариотических клетках. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусоподобные частицы, кодируемые вирусом (VE-VLP), продуцируются в организме пациента с развитием иммуногенного ответа на эндогенный ретровирус.

Предпосылки к созданию изобретения

Более ста лет назад наблюдения показали, что развитие рака тесно связано с иммунной системой, и в настоящее время хорошо известно, что иммунная система защищает организм от новых видов рака на регулярной основе. С другой стороны, злокачественные клетки действуют по механизму «ускользания» от иммунного надзора, что приводит к летальному исходу.

Хотя иммунные клетки способны обнаруживать и уничтожать опухолевые клетки, однако, эта система не всегда функциональна, и это очевидно из того факта, что ежегодно во всем мире от рака умирает почти 9 миллионов человек. Вакцинация, направленная на индуцирование специфических иммунных ответов против опухолевых клеток, является относительно старым методом иммунотерапии рака, но все еще находится на стадии разработки, и только недавно она начала давать соответствующие результаты. Одна из стратегий вакцинации включает вакцинацию с использованием аттенюированных опухолевых клеток, например, путем облучения аутологичных опухолей или аллогенных опухолевых клеточных линий, часто секретирующих гранулоцитарный-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). В обоих случаях, инъецируемый материал включает раковые антигены, которые могут присутствовать в реальной опухоли. Другие стратегии вакцинации включают введение пептидов или белков для индуцирования специфических иммунных ответов. Эти антигены вводят непосредственно в комбинации с адьювантом или в виде антигенов, кодируемых плазмидными ДНК или вирусными векторами.

Хотя методы иммунотерапии постоянно совершенствуются, однако пока еще не существует вакцин широкого спектра действия и высокоэффективных вакцин. Главной причиной этого является описанная ранее иммуносупрессия опухолевыми клетками.

Эндогенные ретровирусы (ERV) являются свидетельством того, что такими древними ретровирусными инфекциями страдали и наши далекие предки. При инфицировании, вирусная РНК подвергается обратной транскрипции в провирусную ДНК, которая была интегрирована в геном хозяина. В конечном счете, провирус был

интегрирован в клетки зародышевой линии и стал наследуемым, в результате чего возникли эндогенные ретровирусы. За миллионы лет, вирусная ДНК передавалась из поколения в поколение и сохранялась у всего населения. В настоящее время известно, что каждый геном человека приблизительно на 8% состоит из эндогенных ретровирусных ДНК, но эти ДНК являются просто останками бывшего ретровируса. Из-за мутаций, делеций и инсерций, большинство ретровирусных генов становились инактивированными или полностью исчезали из генома. В настоящее время, в организме человека больше не присутствует ни один функциональный, полноразмерный эндогенный ретровирус. Тем не менее, ERV прошли процессы дупликации, которые привели к интеграции нескольких копий в геноме хозяина с различными функциональными белками. Таким образом, в некоторых случаях, множество гомологичных ERV еще обладают способностью продуцировать вирусные частицы. Человеческий ERV типа К (HERV-K, HML2) является одним из совсем недавно обнаруженных ERV в геноме человека, и члены этого семейства сохраняют полноразмерные открытые рамки считывания почти для всех вирусных белков.

Различные исследования выявили взаимосвязь между экспрессией ERV и развитием и прогрессированием рака. Обнаружение ERV в человеческих опухолях открыли новые перспективы в разработке противораковой терапии с использованием новых стратегий вакцинации. Ярким примером человеческого ERV (HERV) является HERV типа К (HERV-K), который ассоциируется с раком предстательной железы, раком молочной железы, раком яичника, лимфомой, меланомой, лейкозом и саркомой. Другими примерами являются HERV-H, экспрессирующийся при раке прямой и ободочной кишки, и синцитин-1, экспрессирующийся при раке яичек, раке яичника, раке молочной железы, лимфоме и лейкозе.

Не всегда легко определить, является ли экспрессия белков ERV причиной или следствием развивающейся опухоли. Тем не менее, известно, что условия внутри раковой клетки являются благоприятными для экспрессии ERV. Общее состояние гипометилирования в опухолевых клетках способствует активации генов ERV, которые обычно являются молчащими в здоровых клетках, благодаря метилированию ДНК (Downey, R.F., et al., Human endogenous retrovirus K and cancer: Innocent bystander or tumorigenic accomplice? *Int. J. Cancer*, 2015. 137(6): p. 1249-57. and Gimenez, J., et al., Custom human endogenous retroviruses dedicated microarray identifies self-induced HERV-W family elements reactivated in testicular cancer upon methylation control. *Nucleic Acids Res*, 2010. 38(7): p. 2229-46. Кроме того, экспрессию ERV могут стимулировать экзогенные факторы. Активация человеческих ERV наблюдается, например, при вирусных инфекциях. Экспрессия HERV-W была обнаружена после инфицирования вирусом гриппа и вирусом простого герпеса (Nellaker, C., et al., Transactivation of elements in the human endogenous retrovirus W family by viral infection. *Retrovirology*, 2006. 3: p. 44), а HERV-K наблюдался после инфицирования вирусом Эпштейна-Барра (Sutkowski, N., et al., Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity*, 2001. 15(4): p. 579-89). Независимо от механизма, приводящего к

экспрессии ERV, раковые клетки поддерживают активацию этих белков посредством давления отбора, что указывает на благоприятный эффект ERV в опухолях (Leong, S.P., et al., Expression and modulation of a retrovirus-associated antigen by murine melanoma cells. *Cancer Res*, 1988. **48**(17): p. 4954-8).

Однако не только человеческие опухоли ассоциируются с белками ERV, но также и мышинные раковые клетки экспрессируют ERV. Это обеспечивает идеальную модель организма для изучения влияния ERV на прогрессирование опухоли и для испытания методов терапии путем нацеливания на ERV. Одной из моделей ERV является ретровирус, ассоциированный с меланомой (MelARV), который происходит от провируса вируса мышинного лейкоза (MuLV), присутствующего в мышинном геноме. Большинство инбредных мышинных линий содержат один или две неактивных копии MuLV (Li, M., et al., Sequence and insertion sites of murine melanoma-associated retrovirus. *J Virol*, 1999. **73**(11): p. 9178-86). Тем не менее, мышинная линия AKR имеет три инсерции в геноме и характеризуется высокой продуктивностью MuLV в начале жизни, что вызывает частые случаи возникновения спонтанных лимфом. Другие мышинные линии, такие как C57BL/6, спонтанно продуцируют частицы MULV только в конце жизни. Некоторые другие модели мышинного рака также экспрессируют MULV/MelARV, по аналогии с человеческими ERV.

Поскольку иммунная система вирусного хозяина является естественным механизмом защиты от инфекций, однако, многие вирусы, а особенно ретровирусы, действуют по механизму «ускользания» от иммунного надзора. Одним из механизмов, которые можно наблюдать для всех различных вирусных семейств [Duch et al., WO2013/050048], является индуцирование иммуносупрессорного домена в белках оболочки (ENV), что вызывает подавление иммунной системы на различных уровнях. Иммунные клетки, включая природные киллеры (NK), CD8-T-клетки или регуляторные T-клетки (Treg), могут оказаться под воздействием вирусов, содержащих ISD [Schlecht-Louf et al. (2010)].

Многие ERV содержат белки с иммуносупрессорными доменами (ISD), и такой домен, может также присутствовать в белке Env MelARV (Schlecht-Louf, G., et al., Retroviral infection in vivo requires an immune escape virulence factor encrypted in the envelope protein of oncoretroviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010. **107**(8): p. 3782-7, и Mangeney, M. and T. Heidmann, Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998. 95(25): p. 14920-5). Важное значение ISD в MuLV или MelARV было обнаружено благодаря введению белков Env вируса мышинного лейкоза в опухолевые клетки, которые обычно отторгаются иммунными клетками (Mangeney, M. and T. Heidmann, Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998. 95(25): p. 14920-5). Env-трандуцированные опухолевые клетки растут быстрее, несмотря на присутствие дополнительного экзогенного антигена. Это наблюдение можно объяснить локальным иммуносупрессорным эффектом, опосредуемым белком Env. ISD влияет как на врожденную, так и на адаптивную иммунную систему, на что указывает ингибирование

макрофагов, NK-клеток и Т-клеток (Lang, M.S., et al., Immunotherapy with monoclonal antibodies directed against the immunosuppressive domain of p15E inhibits tumour growth. *Clin Exp Immunol*, 1995. **102**(3): p. 468-75). Кроме того, влияние на субпопуляцию регуляторных Т-клеток также позволяет предположить, что, они, в свою очередь, подавляют другие иммунные клетки (Mangenev, M., et al., Endogenous retrovirus expression is required for murine melanoma tumor growth in vivo. *Cancer Res*, 2005. **65**(7): p. 2588-91). Механизм иммуносупрессии под действием ISD пока еще полностью не изучен, но вероятно, что такой эффект, в основном, опосредуется пептидом CKS-17 в ISD. CKS-17 оказывает различное влияние на иммунную систему, в основном, посредством модификации экспрессии цитокинов (Haraguchi, S., R.A. Good, and N.K. Day-Good, A potent immunosuppressive retroviral peptide: cytokine patterns and signaling pathways. *Immunol Res*, 2008. **41**(1): p. 46-55.). Детальный механизм (Haraguchi, S., R.A. Good, and N.K. Day-Good, A potent immunosuppressive retroviral peptide: cytokine patterns and signaling pathways. *Immunol Res*, 2008. **41**(1): p. 46-55).

Один из первых терапевтических методов нацеливания на ERV-экспрессирующие опухолевые клетки включает введение моноклональных антител. Таким образом, антитела, нацеленные на Env HERV-K, способны снижать рост опухолевых клеточных линий рака молочной железы. Wang-Johanning et al. показали, что наблюдаемый эффект моноклональных антител против Env HERV-K опосредуется изменением клеточного цикла раковых клеток и увеличением их апоптоза. Другой возможный эффект таких антител, который не был протестирован Wang-Johanning et al. (Wang-Johanning, F., et al., Immunotherapeutic potential of anti-human endogenous retrovirus-K envelope protein antibodies in targeting breast tumors. *J Natl Cancer Inst*, 2012. **104**(3): p. 189-210), может представлять собой предотвращение иммуносупрессии. Белок Env HERV-K, подобно Env MelARV, содержит ISD и обладает иммуномодулирующими функциями (Morozov, V.A., V.L. Dao Thi, and J. Denner, The transmembrane protein of the human endogenous retrovirus--K (HERV-K) modulates cytokine release and gene expression. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e70399). Метод, протестированный Wang-Johanning et al., включает введение опухолевых ксенотрансплантатов иммунодефицитным бестимусным мышам. Таким образом, эффект HERV-K может быть направлен только на природные иммунные клетки, такие как NK-клетки.

Другая часть адаптивного иммунного ответа, который может способствовать уничтожению опухолей посредством нацеливания на ERV, включает Т-клетки. Так, например, адаптивно перенесенные Т-клетки против эпитопа Env MuLV в комбинации с IL-2 способны уничтожать метастазы клеток меланомы в легких (Yang, J.C. and D. Perry-Lalley, The envelope protein of an endogenous murine retrovirus is a tumor-associated T-cell antigen for multiple murine tumors. *J Immunother*, 2000. **23**(2): p. 177-83). Аналогичные эксперименты были проведены на гуманизованных мышинных моделях для HERV-K. Т-клетки были генетически модифицированы так, чтобы они экспрессировали на своей поверхности химерный антигенный рецептор (CAR), который распознает Env HERV-K на

раковых клетках. Цитотоксические CAR⁺-Т-клетки были способны лизировать опухолевые клетки и предотвращать метастазы, а также рост опухоли.

В дополнение к прямой инъекции антител или Т-клеток, более практичной, дешевой и эффективной стратегией является индукция иммунных ответов путем вакцинации. Простой подход представляет собой вакцинацию антигенами, кодируемыми вирусом. Однако, этот метод является довольно трудоемким, поскольку сначала необходимо выделить ДК и провести культивирование клеток, а затем провести импульсную обработку определенным HLA-рестриктированным пептидом, и только затем снова ввести их мышам или пациентам.

Более тонкая стратегия вакцинации представляет собой презентацию антигенов (например, белков вирусной оболочки) иммунной системе на вирусоподобных частицах (VLP), которые кодируются рекомбинантным аденовирусом (фигура 1). Эти частицы не содержат вирусных нуклеиновых кислот, а поэтому являются неинфекционными. Тем не менее, VLP являются достаточно иммуногенными, и представленные белки были презентируются в естественных условиях. Так, например, вирусный белок Env, интегрированный в VLP, был презентирован на вирусоподобной поверхности, что способствует правильной укладке и конформации. Помимо преимущества, заключающегося в сильной иммуногенности, стратегия вакцинации VLP также имеет практическую выгоду. Таким образом, VLP могут быть относительно легко получены, поскольку их выделяют только из одного или нескольких белков, и такое продуцирование может быть осуществлено в клеточных культурах.

Для вакцинации против вирусов или вирусного заболевания (например, ERV-экспрессирующего рака), весь белок Env в идеале должен быть представлен иммунной системе для гарантии иммунного ответа против полноразмерного белка-мишени. Однако, поскольку белок Env содержит ISD, то сама вакцина обладает иммуносупрессорной активностью, что нежелательно для иммунизации. Для решения этой проблемы, мутации были введены в ISD в целях сохранения природной конформации белка-мишени, и в то же время предотвращения иммуносупрессии.

Один из первых тестов на инактивирующие мутации в ISD вирусных белков был проведен Schlecht-Louf et al. [Schlecht-Louf et al. (2010)]. Исходя из исследований по сравнению иммуносупрессорного синцитина-2 и неиммуносупрессорного синцитина-1 [Mangeneu et al. (2007)], Schlecht-Louf et al. идентифицировали мутации, которые отключают активность ISD без нарушения общей структуры и функциональных свойств белка Env. Эта стратегия с введением мутации была применена к белкам другого вирусного происхождения (например, HTLV и XMRV), и было проведено более тщательное тестирование на вирус мышинного лейкоза Фрейнда (F-MLV). Это исследование не только выявило подавление обоих NK- и Т-клеток под действием ISD, но также показало, что живой аттенюированный вирус F-MLV, включающий мутантный ISD в белке Env, служит в качестве вакцины против того же самого вируса с последовательностью ISD дикого типа. Защита была обеспечена повышением уровня

антител, а также Т-клеточных ответов против эпитопов F-MLV. Это открытие было, наконец, опубликовано в заявке на патент WO 2011/092199, где особое внимание уделяется вирусу, который является родственным ксенотропному вирусу мышинного лейкоза (XMRV), и который ассоциируется с раком предстательной железы человека и синдромом хронической усталости. Следовательно, WO 2011/092199 относится к специфическим мутациям ISD в XMRV и к применению таких вирусов с мутированным ISD для разработки стратегий вакцинации.

Другое применение мутации ISD было описано в заявке на патент WO 2014/195510. В этом случае, мутация ISD была введена в кошачий вирус иммунодефицита (FIV) в целях снижения иммуносупрессии под действием вируса с сохранением природной конформации. В WO 2014/195510 описано, что специфические мутации приводят к повышению уровней гуморальных ответов против белка Env FIV при его введении в способе вакцинации в форме, связанной с MBP, или в форме, трансдуцированной в трансплантированные опухолевые клетки. Таким образом, WO 2014/195510 относится к мутациям в ISD Env FIV и к применению таких мутантных белков в стратегиях вакцинации против инфекции, вызываемой FIV или другими лентивирусами.

Другой подход, относящийся к более широкому спектру мутаций ISD в вирусном белке Env, описан в заявке на патент WO 2013/050048. В частности, WO 2013/050048 относится к получению антигенов сначала путем идентификации ISD в оболочечных РНК-вирусах, а затем мутации этих доменов для снижения иммуносупрессии в процессе вакцинации. Стратегия идентификации ISD основана на 4-х параметрах, которые заключаются в том, что: 1) пептид находится в гибридном белке оболочечных РНК-вирусов, 2) пептид способен взаимодействовать с мембранами, 3) высокая степень гомологии в первичной структуре (последовательности) пептида наблюдается для отряда, семейства, подсемейства, рода или вида вирусов, 4) положение на поверхности гибридного белка в данной конформации является отличительным признаком иммуносупрессорных доменов, на что указывает 3D-структура или окрашивание антителом. После идентификации потенциального ISD в представляющем интерес вирусном Env, была подтверждена иммуносупрессорная функция, а затем в ISD были введены мутации, и было подтверждено снижение иммуносупрессии по меньшей мере на 25%. В целом, в WO 2013/050048 описаны идентификация ISD в оболочечных РНК-вирусах, поколение пептидов с мутированным ISD, а также применение указанных пептидов в качестве вакцин и получение антител.

Важное значение презентации кодируемого антигена одновременно в аденовирусном векторе и на поверхности вирусного капсида было показано Bayer et al. [Bayer et al. (2010)]. Преимущество презентации антигенов в упорядоченной структуре, которая стимулирует перекрестное связывание В-клеточных рецепторов, было известно и ранее. Однако, описанное Bayer et al. кодирование различных белков F-MLV, таких как субъединицы Gag и Env gp70 и p15E, с одновременным представлением таких антигенов

на аденовирусном капсидном белке PIX, показало, что только комбинация кодируемых и презентированных на капсиде антигенов способна повышать уровень функциональных антител. Это наблюдение можно объяснить тем, что несмотря на презентацию на аденовирусном капсиде, стимулирующую перекрестное связывание В-клеточных рецепторов, для достижения значимых CD4⁺-Т-клеточных ответов, стимулирующих аффинное созревание В-клеток, необходимы кодируемые антигены. С применением такой стратегии вакцинации Bayer et al. удалось снизить вирусную нагрузку F-MLV после заражения. Однако, не существует каких-либо данных, указывающих на повышение CD8⁺-Т-клеточных ответов против антигена-мишени.

Shoji et al. сосредоточили свое внимание в первую очередь на оптимизацию вакцины против ВИЧ на основе аденовирусов. Несмотря на стратегии оптимизации по кодонам и использование различных промоторов, было осуществлено совместное кодирование белка Gag и Env в аденовирусе посредством расщепляемого сайта фурина (F2A). Это позволило осуществлять одновременную экспрессию обоих белков и, таким образом, получить *in situ* VLP на основе Gag. В этом исследовании были обнаружены самые высокие иммунные ответы по сравнению с другими стратегиями презентации, которые не стимулировали образование VLP *in situ* [Shoji et al., 2012].

Duch et al., 2011 (US20110305749A1) получили ретровирусные вакцины против ВИЧ на основе VLP и продемонстрировали повышение иммуногенности белков оболочки ВИЧ с мутированным ISD. Иммуногены VLP были получены и очищены *ex vivo*.

US2012189647 относится к мутантному оболочечному белку, полученному в результате мутации иммуносупрессорного домена трансмембранной субъединицы белка оболочки дикого типа. US2009324553 относится к химерным политропным полипептидам вирусной оболочки, применяемым для нацеленного таргетинга и регулируемого слияния вирусных частиц с другими клеточными мембранами.

Кроме того, в публикации Hohn et al. [Hohn et al., 2014] описано, что, при экспрессии оптимизированного по кодонам варианта HERV-K113 под контролем промотора CMV, тип сборки вируса и его морфология были изменены. В частности, VLP сохранялся на клеточной поверхности и не содержал Env.

Несмотря на использование предыдущих стратегий мутации ISD в вирусных белках Env и использование аденовируса для кодирования и презентации вирусных антигенов, разработанные ранее стратегии вакцинации с использованием мутаций ISD были направлены исключительно на предотвращение вирусных инфекций [Schlecht-louf et al. 2010; WO 2011/092199; WO 2014/195510; US20110305749; WO 2014/195510]. Следовательно, все еще существует необходимость в нарушении толерантности к собственным антигенам. Кроме того, система синтеза вирусоподобных частиц *in situ* была использована ранее [Luo et al. (2003); Sohji et al. (2011); Andersson et al. (2016); Andersson & Holst (2016); Andersson et al. (2017)] для антигенов Env ВИЧ и малярийных антигенов, но не для презентации Env ERV с мутированным ISD на синтезированных VLP *in situ*. Кроме того, как было показано Hohn et al., существует также необходимость в разработке

эффективной системы, позволяющей получать VLP, а в частности, VLP HERV-K.

Целью настоящего изобретения является получение эффективной вакцины для профилактики и/или лечения заболевания, вызываемого эндогенным ретровирусом. Вакцина согласно изобретению дает повышенный иммунный ответ посредством любого из путей выработки ответа, инициированных CD4-Т-клетками или CD8-Т-клетками.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении заболевания, где указанная вакцина включает аденовирусный вектор, способный кодировать вирусоподобные частицы (VLP), где указанные VLP презентуют неактивный иммуносупрессорный домен (ISD).

Для разработки вакцин для продуцирования VLP используется ряд вирусных векторов, включая ВИЧ, бакуловирусы, лентивирусы и аденовирусы. Авторами настоящего изобретения было показано, что аденовирусный вектор, кодирующий ERV с инактивированным ISD, неожиданно оказался более эффективным, чем, например, ВИЧ-вектор в комбинации с инактивированным ISD. Таким образом, настоящее изобретение позволяет достичь неожиданно высокого иммунного ответа, приводящего к стимуляции иммуносупрессии в опухолях.

Хотя предполагается, что в настоящем изобретении для получения удовлетворительного результата могут быть использованы любые аденовирусные векторы, однако, в настоящее время существует мнение, что наилучший результат может быть достигнут в том случае, если аденовирусный вектор происходит от аденовирусов млекопитающих, а именно, аденовируса человека, аденовируса шимпанзе или аденовируса гориллы. Человеческие аденовирусные векторы имеют по меньшей мере 52 различных серотипа, например, типа 1, 2, 5, 19, 28, 35 и 40. В случае выбора человеческого аденовируса, человеческим аденовирусным вектором является вектор, происходящий от векторов группы D, человеческого аденовируса серотипа Ad5, человеческого аденовируса серотипа Ad19a, человеческого аденовируса серотипа Ad26 или аденовируса шимпанзе. Авторы настоящего изобретения использовали аденовирус типа 5 (Ad5) в качестве исходного материала для получения вакцинного вектора благодаря хорошим доклиническим результатам иммунизации. Причиной, по которой Ad5 индуцирует достаточно сильные иммунные ответы против белка-мишени, является не только эффективный транспорт в антиген-презентирующие клетки (АПК), но также и адьювантное свойство самого вектора, которое стимулирует природный иммунитет. Кроме того, были индуцированы транскрипция и высвобождение иммуностимулирующих цитокинов, таких как IFN, IL-6, IL-12, IL-15 и TNF- α . Эти цитокины играют важную роль в иммунной системе и служат в качестве активаторов для клеток адаптивного иммунного ответа. Особым преимуществом Ad5 является то, что иммунные ответы против вектора являются не очень сильными, так как, в противном случае, это могло бы препятствовать экспрессии трансгена. Ad5 уравнивает врожденный иммунитет до уровня, который позволяет экспрессировать трансгены и в то же время активировать адаптивные

иммунные ответы. Что касается публикации Matthew J. Johnson et al. (J. Immunol 2012; 188: 6109-6118), где показано, что рекомбинантный аденовирус серотипа 28 и рекомбинантный аденовирус серотипа 35 инфицирует и приводит к *in vitro* созреванию и активации человеческих и мышинных дендритных клеток более эффективно по сравнению с рекомбинантным аденовирусом серотипа 5, то было неожиданно обнаружено, что Ad5 дает желаемый ответ в описанных здесь экспериментах. Кроме того, в другой работе Matthew J. Johnson et al. (Vaccine 32 (2014) 717-724) показано, что рекомбинантный аденовирус серотипа 28 и рекомбинантный аденовирус серотипа 35 повышают апоптоз антигенпрезентирующих клеток (АПК), таких как моноциты, по сравнению с rAd5 и ложноинфицированным контролем.

Иммуносупрессорный домен (ISD) можно рассматривать в качестве механизма для опухолей, позволяющего сбалансировать противоопухолевые иммунные ответы при одновременном сохранении опухоль-стимулирующей воспалительной среды, индуцированной активацией ERV, аналогично природной инфекции. ISD влияет на врожденную и адаптивную иммунную систему за счет ингибирования макрофагов, NK-клеток и Т-клеток. Однако точный механизм иммуносупрессии под действием ISD пока еще полностью не изучен. Как показано в настоящем изобретении, инактивация ISD приводит к значительному повышению ответа.

Сегмент ISD может быть инактивирован путем мутации или делеции одной или более аминокислот. В случае проведения инактивации посредством мутации, одну или более аминокислот заменяют другой аминокислотой, обычно, выбранной из других 19 природных аминокислот. В случае делеции, любая одна или более аминокислот в области ISD могут быть делетированы. Специалист в данной области обладает достаточными знаниями или опытом по замене аминокислот для достижения удовлетворительного иммунного ответа посредством проведения, но необязательно, оценки результатов начальных испытаний.

В определенном варианте осуществления изобретения, ISD имеет пептидную последовательность LANQINDLRQTVIW (SEQ ID NO. 1), LASQINDLRQTVIW (SEQ ID NO. 2), LQNRRGLDLLTAEKGGGL (SEQ ID NO. 3), LQNRRALDLLTAERGGT (SEQ ID NO. 4), LQNRRGLDMLTAAQGGI (SEQ ID NO. 5) или YQNRLALDYLLAEGGV (SEQ ID NO. 6), имеющие делеции или замены по меньшей мере одной из аминокислот другой аминокислотой. Предпочтительно, чтобы аминокислота, отличающаяся от исходной аминокислоты, была выбрана из природных аминокислот. Сегмент ISD ERV, кодируемый в Ad5 и используемый в примерах настоящей заявки, имеет следующую аминокислотную последовательность: LQNRRGLDLLFLKEGGL (SEQ ID No. 7). ISD может быть инактивирован путем введения одной или более мутаций в аминокислотную последовательность. Специалист в данной области может модифицировать аминокислотную последовательность путем мутаций или делеций в любом количестве или в любой форме, подходящей для замены отдельных аминокислот, то есть, ISD, предпочтительно, используемый в настоящем изобретении, имеет следующую

последовательность: LQNRRLDLLFLKRGGL (SEQ ID No.8).

Может оказаться предпочтительной замена одной или более аминокислот в области, расположенной выше или ниже сегмента ISD. Мутацией является компенсирующая мутация, введенная для сохранения структуры домена, так, чтобы она могла действовать еще и для инфекционного вируса. Таким образом, в определенном варианте осуществления изобретения, по меньшей мере одна из аминокислот в области из 10 аминокислот, расположенной выше или ниже ISD, была заменена другой аминокислотой. В конкретном варианте, представленном на фигуре 3, 3-я аминокислота, фланкирующая область ISD, была заменена путем мутации A → F.

Для инактивации ISD согласно изобретению, необходимо, чтобы иммуносупрессорная активность снижалась на 70% или более по сравнению с иммуносупрессорной активностью, достигаемой под действием исходного ISD. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, ISD инактивируется на 80% или более, например, на 90% или более, например, на 95% или более, например, на 99% или более по сравнению с иммуносупрессией, достигаемой под действием исходного ISD.

Настоящее изобретение относится к общей платформе для презентации антигенов иммунной системе организма. Таким образом, в принципе, при кодировании белка любого типа желательно, чтобы он был включен в аденовирусный вектор для выработки иммунного ответа против этого вируса. В предпочтительном аспекте изобретения, антиген представляет собой эндогенные белки ретровирусной оболочки (Env ERV) или иммуногенные белки, происходящие от таких белков. Обычно считается, что вакцина на основе вирусоподобных частиц, кодируемых вирусом, направляет Env ERV в дендритные клетки (ДК) для презентации антигенов клеткам адаптивной иммунной системы. Презентация на МНС класса I индуцирует активацию и пролиферацию CD8⁺-Т-клеток. Эти цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), специфичные к антигенам Env ERV, инфильтрируются в опухоли и уничтожают клетки, презентующие соответствующий антиген. Презентация антигенов на МНС класса II специальными антигенпрезентирующими клетками (АПК) активирует CD4⁺-Т-клетки, которые ко-активируют В-клетки. Активированные В-клетки, которые взаимодействуют с белком-мишенью Env ERV в кровотоке, или антигены, презентируемые на VLP, высвобождают антитела, специфичные к Env ERV. Эти антитела способны связываться со своей мишенью на раковых клетках, что будет приводить к разрушению и фагоцитозу злокачественных клеток. Таким образом, ERV-специфические антитела способны предотвращать рост опухоли и метастазы. Восстановленная иммуногенность опухолевых клеток позволяет примировать серию различных опухолеспецифических Т-клеток, распознающих различные опухолеассоциированные и опухоль-специфические антигены. Эти только что примированные и размноженные ЦТЛ проникают в опухоль и уничтожают злокачественные клетки.

Хотя вакцина согласно изобретению, в принципе, может быть использована для иммунизации млекопитающих ряда видов, а реально была разработана с использованием

мышей-моделей, однако, в предпочтительном аспекте изобретения, белок ERV представляет собой человеческий эндогенный ретровирусный белок (HERV) или его иммуногенную часть. Было определено, что каждый человеческий геном приблизительно на 8% состоит из эндогенных ретровирусных ДНК. Тем не менее, большая часть эндогенных ретровирусных ДНК являются лишь останками бывшего ретровируса. ERV являются свидетельством того, что такими древними ретровирусными инфекциями страдали и наши далекие предки. При инфицировании, вирусная РНК подвергается обратной транскрипции в провирусную ДНК, которая была интегрирована в геном хозяина. В конечном счете, провирус был интегрирован в клетки зародышевой линии и стал наследуемым, в результате чего возникли эндогенные ретровирусы. За миллионы лет, вирусная ДНК передавалась последующим поколениям и сохранялась у всего населения. Из этого следует, что большая часть человеческого генома может быть использована в качестве антиген-кодирующей части аденовирусного вектора. В настоящее время, HERV предпочтительно выбирают из группы, состоящей из HERV-K, HERV-H, HERV-W, HERV-FRD, и HERV-E. Более конкретно, HERV-K может быть выбран из группы, состоящей из HERV-K108 (=ERVК-6), ERVK-19, HERV-K115 (=ERVК-8), ERVK-9, HERV-K113, ERVK-21, ERVK-25, HERV-K102 (=ERVК-7), HERV-K101 (=ERVК-24), HERV-K110 (=ERVК-18); HERV-H может быть выбран из группы, состоящей из HERV-H19 (=HERV-H_2q24.3), HERV-H_2q24.1; HERV-W может быть выбран в качестве ERVW-1 (=синцитина-1); а HERV-FRD может быть выбран в качестве ERVFRD-1 (=синцитина-2).

Аденовирусный вектор был сконструирован так, чтобы кодируемый белок ERV мог быть презентируван иммунной системе с выработыванием подходящего иммунологического ответа. В подходящем аспекте изобретения, эпитоп белка ERV или его иммуногенная часть расположены между трансмембранным доменом и ISD.

Описанные здесь эксперименты показали, что кодируемые аденовирусом VLP HERV-K с мутированным ISD могут быть использованы не только в Ad5, но также и в аденовирусе другого серотипа, т.е. Ad19 (см., Примеры 15-17). Как показано ранее, HERV-K ассоциируются с раком, и было обнаружено, что он содержит функциональный оболочечный домен ISD с активностью *in vitro*, аналогичной активности ВИЧ ((Morozov et al., 2013). У мышей, HERV-K представляет собой чужеродный антиген с активностью домена ISD, аналогичной активности доменов ISD с мутациями, которые априори не будут усиливать иммунные ответы. Однако, было неожиданно обнаружено, что мутация ISD повышает гуморальные ответы против белков p15E Env HERV-K и доменов SU, Т-клеточные ответы и защиту от рака. Мутации в HERV-K отличаются от мутаций, описанных здесь для MelARV, поскольку вирусные семейства различаются последовательностями ISD. Однако, исходя из представленной здесь информации и общих знаний, специалист в данной области может самостоятельно идентифицировать подходящие мутации, инактивирующие ISD также и в других семействах вирусов. Используемая здесь мутация HERV-K была выявлена по мутациям ISD в ВИЧ, и было

показано, что эти мутации сохраняют инфекционность вируса и сайт-специфическую консервативность между HERV-K и ВИЧ-1 (Morozov et al., 2012). После анализа трансфецированных вектором клеток было обнаружено повышение уровня экспрессии мутаций HERV-K внутри клеток и на их поверхности (см. Пример 15 и фигуру 24), что позволяет объяснить повышенную иммуногенность и на этой основе разработать дополнительную механистическую стратегию введения мутаций ISD в белки Env семейства HERV-K с применением любого метода генетической экспрессии и конструкций, которые могут образовывать, а могут и не образовывать, VLP.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей белок оболочки ERV или иммуногенную часть, где ISD указанного белка содержит мутации, которые делают ISD неактивным. Предпочтительно, ERV представляет собой человеческий эндогенный ретровирус (HERV), а более предпочтительно, HERV представляет собой HERV-K. Кроме того, предпочтительно, чтобы мутация в ISD представляла собой замену Q525 на аланин так, чтобы последовательность мутантного ISD представляла собой NSQSSIDQKLANAINDLRQT (SEQ ID NO: 50) (вместо NSQSSIDQKLANQINDLRQT; SEQ ID NO: 49). Следует отметить, что также рассматриваются соответствующие мутации в ISD с заменой другой последовательностью. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержится в аденовирусном векторе. Более предпочтительно, аденовирусным вектором является аденовирусный вектор типа 19 (Ad19). Кроме того, предпочтительно, чтобы аденовирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодировал VLP. Кроме того, настоящее изобретение также относится к белку, кодируемому указанной молекулой нуклеиновой кислоты или указанным вектором. Молекула нуклеиновой кислоты, вектор или кодируемый им белок могут быть использованы для лечения или профилактики заболевания, где указанным заболеванием, предпочтительно, является рак. Раковым заболеванием, поддаваемым лечению, является рак, при котором экспрессируется соответствующий ERV. Предпочтительно, лечение включает схему «прайм-буст», где сначала вводят аденовирус или молекулу нуклеиновой кислоты, а затем вводят MVA, аденовирус или ДНК. Предпочтительно, чтобы бустер-дозой являлась бустер-доза MVA. Рассматриваются также различные периоды времени между введением первой дозы и бустер-дозы. В частности, у онкологических больных с минимально резидуальной болезнью могут быть длинные промежутки между первым введением и введением бустер-дозы. В предпочтительной схеме введения, бустер-дозу вводят через 4-8 недель после введения первой дозы.

В предпочтительном аспекте вакцины согласно изобретению, белковый продукт аденовирусного вектора включает белок gag, пептид 2A и белок оболочки (Env). Кроме того, белок Env может содержать поверхностную единицу (gp70), сайт расщепления и трансмембранную единицу (p15E). Кроме того, трансмембранная единица (p15E) может содержать гибридный пептид, иммуносупрессорный домен (ISD), трансмембранный якорь

и цитоплазматический хвост.

Для повышения иммуносупрессии вакцины может оказаться желательным, чтобы p15E или ее иммуногенная часть были связаны с аденовирусным капсидным белком pIX. Для достижения этой цели, p15E своим N-концом была присоединена к C-концу pIX. В высокой степени упорядоченная структура pIX и связанного с ним антигена на аденовирусной поверхности способствует перекрестному связыванию с В-клеточными рецепторами. Другим преимуществом является то, что pIX обычно презентуется как тример и может также стимулировать презентацию связанного антигена p15E в природной тримерной форме. Было показано, что такая модификация повышает уровень индуцирования специфических антител у мышей CD1.

В определенном аспекте настоящего изобретения, сигнальный пептид, кодируемый аденовирусным вектором, заменяют сигнальным пептидом люциферазы *Gaussia* (LucSP). Этот сигнальный пептид усиливает транспорт белков во внешнюю клеточную мембрану без изменения статуса гликозилирования. Таким образом, этот сигнальный пептид, включенный вместо нативной последовательности, способствует переносу синтезированных белков в мембрану, где они интегрируются в VLP.

В другом аспекте настоящего изобретения, трансмембранный якорь и цитоплазматический хвост, кодируемые аденовирусным вектором, заменяют трансмембранным доменом и цитоплазматическим хвостом гемагглютинаина вируса гриппа А. Встраивание способствует повышению уровня экспрессии рекомбинантных белков на клеточной поверхности и на VLP, что приводит к вырабатыванию сильных гуморальных ответов широкого ряда. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, трансмембранный якорь и цитоплазматический хвост, кодируемые аденовирусным вектором, заменяют трансмембранным доменом и цитоплазматическим хвостом гемагглютинаина H3N2 вируса гриппа А (HA-TMCT).

В другом аспекте изобретения, последовательность тримеризации вводят рядом с сигнальным пептидом. Последовательность тримеризации может быть присоединена к белку для облегчения природной презентации. В предпочтительном аспекте изобретения, последовательностью тримеризации является GCN4.

Белковый продукт аденовирусного вектора обычно включает белок gag, где белок gag представляет собой экзогенный ретровирусный белок gag или эндогенный ретровирусный белок gag.

Аденовирусный вектор обычно необходим клетке для продуцирования вирусоподобной частицы. Таким образом, аденовирусный вектор инфицирует клетку и продуцирует компоненты для VLP. В определенном аспекте изобретения, VLP продуцируется в изолированной клеточной линии. Подходящими примерами являются клетки Sf9, клетки Vero, клетки HeLa и т.п. Однако, в настоящее время желательно, чтобы VLP продуцировалась в клетке организма пациента, инфицированного аденовирусным вектором. Такой продукт также называется вирусоподобными частицами, кодируемыми вирусом (VE-VLP) и имеет то преимущество, что он позволяет исключить промежуточного

хозяина для продуцирования VLP.

Настоящее изобретение также относится к конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-мишень, способный образовывать вирусоподобную частицу (VLP), где белок-мишень содержит иммуносупрессорный домен (ISD), где указанный ISD является неактивным.

Настоящее изобретение является особенно подходящим для профилактики и/или лечения рака. Типы рака, подвергаемого лечению в соответствии с настоящим изобретением, не имеют конкретных ограничений, и включают рак предстательной железы, рак молочной железы, рак яичника, лимфому, меланому, лейкоз, саркому, рак прямой и ободочной кишки, рак яичек, рак яичника, рак молочной железы, лимфому, рак легких и рак печени.

При определенных условиях может оказаться предпочтительным лечение пациента по схеме «прайм-буст». Таким образом, одним из вариантов осуществления изобретения является применение вакцины для профилактики и/или лечения рака, где указанное применение включает стадию примирования пациента вышеописанной конструкцией нуклеиновой кислоты по меньшей мере за 5 дней до введения бустер-дозы вакцины, описанной выше.

Настоящее изобретение также относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении рака, где указанное применение включает стадию последующего лечения пациента через 5 дней или более после лечения пациента вышеописанной вакциной, содержащей кодируемые вирусом VLP, отличающиеся от VLP, происходящих от аденовирусного вектора. В определенном варианте осуществления изобретения, кодируемые вирусом VLP, отличающиеся от VLP, происходящих от аденовирусного вектора, представляют собой VLP, происходящие от модифицированной осповакцины Анкара (MVA).

Кроме того, неожиданно было обнаружено, что, вопреки сообщению Hohn et al. 2014, касающемуся оптимизированного по кононам HERV-K113 под контролем промотора CMV, используем экспрессионный кластер, то есть, Gag-P2A-ENV вместе с Env, экспрессируемым в отношении 1:1 с Gag под контролем сильного промотора, не удерживался в клеточной мембране. Вместо этого, экспрессировались VLP, которые (опять же в отличие от результатов, представленных Hohn et al.) также содержали Env. Это указывает на то, что генетическая платформа с Gag-p2a-Env работает лучше по сравнению с конструкцией без p2a (или соответствующего функционально присоединенного линкера).

Таким образом, настоящее изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Gag и белок оболочки ERV (Env) или его иммуногенную часть, где нативная геномная структура, соединяющая Gag и Env, была заменена функционально присоединенным линкером. Предпочтительно, указанный функционально присоединенный линкер представляет собой p2A. Другими словами, настоящее изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей

экспрессионный кластер «Gag-функционально присоединенный линкер - Env», а предпочтительно, кластер Gag-p2A-Env. Предпочтительно, ERV представляет собой HERV-K. Более предпочтительно, ERV представляет собой HERV-K113. Кроме того, предпочтительно, чтобы последовательность HERV-K представляла собой консенсусную последовательность HERV-K, а более предпочтительно, оптимизированную по кодонам консенсусную последовательность. Еще более предпочтительно, оптимизированная по кодонам консенсусная последовательность HERV-K представляет собой нижеследующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 55):

MGQTKSKIKSKYASYLSFIKILLKRGGVKYSTKNLIKLFQIEQFCPWFPEQGTLDL
 KDW
 KRIGKELKQAGRKGNIIPLTVWNDWAIKAALEPFQTEEDSVSVSDAPGSCIIDCN
 ENTR
 KKSQKETEGHLHCEYVAEPVMAQSTQNVQDYNQLQEVYYPETLKLEGKGPPELVGPS
 ESKPRG
 TSPLPAGQVPVTLQPQKQVKENKTQPPVAYQYWPPAELQYRPPPEQYGYPGMP
 PAPQGR
 APYPQPPTRRLNPTAPPSRQGSSELHEIIDKSRKEGDEAWQFPVTLEPMPPGEGAQ
 EGEP
 PTVEARYKSFSIKMLKDMKEGVKQYGPNSPYMRTLLDSIAHGHRLIPYDWEILA
 KSSLSP
 SQFLQFKTWWIDGVQEQVRRNRAANPPVNIDADQLLGIGQNWSTISQQALMQN
 EAIEQVR
 AICLRAWEKIQDPGSTCPSFNTVRQGSKEPYPDFVARLQDVAQKSIADKARKVI
 VELMA
 YENANPECQSAIKPLKGVKVPAGSDVISEYVKACDGIGGAMHKAMLMAQAITGV
 VLGGQVR
 TFGGKCYNCGQIGHLKKNCVPLNKQNITIQATTTGREPPDLCPRCKKGKHWASQ
 CRSKFD
 KNGQPLSGNEQRGQPQAPQQTGAFFIQPFVPPQGFQGGQPPLSQVFQGISQLPQYN
 NCPPP
 QAAVQQGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMNPSEMQRKAPPRRRRHRNRAPLTH
 KMNKMT
 SEEQMKLPSTKKAEPPTWAQLKLTQLATKYLENTKVTQTPESSMLLAALMIVSM
 VVSLPM
 PAGAAAANYTYWAYVFPPLIRAVTWMDNPIEVYVNDVWVPGPIDDRCPAKP
 EEGMMI
 NISIGYRYPPICLGRAPGCLMPAVQNWLVEVPTVSPISRFTYHMOVSGMSLRPRVN
 YLQDF
 SYQRSKFRPKGKPCPKKEIPKESKNTEVLVWEECVANSVILQNNNEFGTIIDWAP
 RGQFY

HNCSGQTQSCPSAQVSPA VSDSLTESLDKHKHKKLQSFYPWEWGEKGISTPRPKI
VSPVS

GPEHPELWRLTVASHHIRIWSGNQTLERDRKPFYTVDLNSSLTVPLQSCVKPPY
MLVVG

NIVIKPDSQTITCENCRLTLCIDSTFNWQHRILLVRAREGVWIPVSMDRPWEASPS
VHIL

TEVLKGVNRSKRIFITLIAVIMGLIAVTATAAVAGVALHSSVQSVNFVNDWQK
NSTRWLW

NSQSSIDOKLANQINDLRQTVIWMGDRLMSLEHRFQLQCDWNTSDFCITPQIYN
ESEHHW

DMVRRHLQGREDNLTLDISKLKEQIFEASKAHLNLVPGTEAIAGVADGLANLNP
VTWVKT

IGSTTIINLILVCLFCLLLVCRCTQQLRRDSHRERAMMTMAVLSKRKGGNVG
KSKRD

QIVTVSV.

Кроме того, предпочтительно, чтобы HERV-К содержал мутацию в своем ISD (который подчеркнут и выделен жирным шрифтом в приведенной выше последовательности). Особенно предпочтительная последовательность, содержащая такую мутацию, показана в SEQ ID NO: 48.

Кроме того, предпочтительно, чтобы молекула нуклеиновой кислоты представляла собой аденовирусный вектор. Предполагается, что нуклеиновая кислота может быть использована в качестве генетической вакцины, а в частности, для профилактики и/или лечения заболевания, предпочтительно рака. Альтернативно, молекула нуклеиновой кислоты может быть также использована для продуцирования VLP, а в частности, HERV-К VLP *in vitro*. Затем, полученные VLP могут быть использованы в иммунотерапии, а в частности, для профилактики и/или лечения заболевания, предпочтительно, рака. Следует отметить, что в этом контексте, рак, подлежащий лечению, представляет собой рак, при котором экспрессируется ERV.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к VLP, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Gag и белок оболочки ERV (Env) или его иммуногенную часть, где нативная геномная структура, соединяющая Gag и Env, была заменена функционально присоединенным линкером. Предпочтительно, указанный функционально присоединенный линкер представляет собой p2A. Также предпочтительно, чтобы ERV представлял собой HERV-К. Более предпочтительно, ERV представляет собой HERV-K113. Предпочтительно, указанные VLP содержат большее количество Env по сравнению с VLP HERV-K113, продуцируемыми методом, описанным Hohn et al. Как уже упоминалось выше, рассматривается также применение таких VLP в иммунотерапии. Кроме того, настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты или VLP в целях их применения для профилактики и/или лечения заболевания. Предпочтительным заболеванием является рак. Следует отметить, что рак представляет

собой рак, при котором экспрессируется соответствующий ERV.

Краткое описание чертежей

В последующей подробной части настоящего изобретения, аспекты, варианты осуществления и применения будут объяснены более подробно со ссылкой на примеры осуществления вариантов изобретения, представленные на чертежах, где:

На фиг. 1 раскрывается механизм действия вирусоподобных частиц, кодируемых вирусным вектором. Вакцина содержит рекомбинантный аденовирус (Ad5), кодирующий вирусные белки Gag и Env. После инъекции, Ad5 инфицирует клетки и индуцирует экспрессию кодируемых белков. Gag и Env связываются посредством саморасщепляющегося пептида (p2A), что будет гарантировать не только эквимоллярную экспрессию обоих белков, но также и их разделение после трансляции. Одного структурного белка Gag достаточно для индуцирования почкования из клеточной мембраны и образования вирусоподобных частиц (VLP). Во время образования VLP, Env ассоциируется с Gag и интегрируется в высвобождаемые VLP. Таким образом, вакцинация вектором Ad5 индуцирует продуцирование VLP, которые на своей поверхности презентуют белок-мишень Env иммунной системе.

На фигуре 2 схематически показана структура белка оболочки MuLV/MelARV. Белок оболочки (Env) состоит из двух субъединиц. (слева): Трансмембранная субъединица p15E (TM) закорена в клеточной мембране и содержит иммуносупрессорный домен (ISD) и гибридный пептид. p15E ковалентно связан посредством дисульфидных мостиков с поверхностной субъединицей gp70 (SU). p15E, а особенно ISD, экранированы субъединицей gp70 для предотвращения связывания с антителом. (справа): Белковые субъединицы экспрессируются как белок-предшественник, который расщепляется во время процессинга и транспортируется в мембрану. Эта фигура взята из публикации Mangeney et al., 2007 с изменениями.

На фигуре 3 показаны мутации в ISD кодируемого вакциной Env MelARV (p15E). Две аминокислоты в ISD p15E были заменены для инактивации иммуносупрессорного механизма. Таким образом, были сделаны следующие аминокислотные замены: E₁₄ → R₁₄ и A₂₀ → F₂₀.

На фигуре 4 показаны векторные карты 768tet и Capture-pBGN. Показаны также ДНК-векторы 768tet (A) и Capture-pBGN (B) с соответствующими генами. На векторной карте, дополнительные гены, присутствующие в плаزمиде, не показаны. Белки-мишени были сначала клонированы в экспрессионный вектор 768tet (A). Экспрессионный кластер, включающий белок-мишень, был затем клонирован в геномный вектор человеческого Ad5 (hAd5) Capture-pBGN (B) с помощью гомологичной рекомбинации для получения рекомбинантных вирусов в клеточных линиях-продуцентах.

На фигуре 5 описаны стадии продуцирования рекомбинантного Ad5. На схеме показан процесс клонирования белка-мишени в Capture-pBGN с последующим продуцированием вируса. Продуцирование рекомбинантного Ad5 включает последовательные стадии получения «вирусного лизата», «3-дневного лизата» и

«крупномасштабного лизата», содержащих рекомбинантный вирус.

Фигура 6: Пептид, используемый для ELISA-анализа p15E-специфических гуморальных ответов. Область Env MelARV, показанная стрелкой и обозначенная как «TM (p15E)», была синтезирована как пептид и использована для ELISA-анализа проб сыворотки крови от вакцинированных мышей.

Фигура 7: Гуморальные ответы, индуцированные Ad5-MelARV-ISD у мышей CD1. (A) p15E-специфические антитела в сыворотке вакцинированных мышей CD1 (схема вакцинации IV). Мыши были вакцинированы сначала ДНК, кодирующей MelARV, MelARV-ISD или GFP (как описано под графиком), а затем путем введения другой бустер-дозы Ad5 (надписи). Вакцины, используемые для бустер-дозы, представляют собой Ad5-MelARV (темно-серый), Ad5-MelARV-ISD (светло-серый) или Ad5-GFP (белый). Связывание антител с p15E анализировали с помощью ELISA. Столбики на гистограммах означают среднюю оптическую плотность по сравнению с контрольной сывороткой LEV76 ± ср. кв. ош. Размер выборки составлял n=5 в каждой группе. (B) B16F10-GP-специфические антитела. Клетки B16F10-GP инкубировали с сывороткой крови тех же мышей, как и в (A). Связывание антител детектировали с использованием APC-конъюгированного «второго» антитела против мышинового IgG с помощью проточной цитометрии. Средняя интенсивность флуоресценции для каждой вакцинированной группы представлены как среднее ± ср. кв. ош. Звездочки указывают на значимые различия между группами, * (P ≤ 0,05); ** (P ≤ 0,01); *** (P ≤ 0,001).

Фигура 8: Гуморальные ответы и число метастазов у Ad-MelARV-ISD-вакцинированных мышей C57BL/6. Мышей вакцинировали ДНК-MelARV и Ad5-MelARV (ДНК+Ad5-MelARV) или ДНК-MelARV-ISD и Ad5-MelARV-ISD (ДНК+Ad5-MelARV-ISD) по схеме «приём-буст» в соответствии со схемой вакцинации III. (A) Связывание рак-специфических антител с клетками B16F10-GP. Антитела в сыворотке крови вакцинированных мышей, специфичные к опухолевым клеткам, анализировали методом проточной цитометрии с использованием APC-конъюгированных «вторых» антител против мышинового IgG. Столбики на гистограммах означают среднюю интенсивность флуоресценции связанных антител в каждой группе. (B) Антитела, связывающиеся с p15E, анализировали с помощью ELISA. Значения представлены как среднее для каждой группы ± ср. кв. ош. SEM. (C) Ввакцинированных мышей внутривенно заражали клетками B16F10-GP и через 14 дней анализировали метастазы в легких. Горизонтальными линиями показано среднее число метастазов в каждой группе. Группы включают n=7 (ДНК+Ad5-MelARV) или n=8 (ДНК+Ad5-MelARV-ISD) мышей.

Фигура 9: ELISPOT-анализ Т-клеточных ответов, индуцированных Ad5-MelARV-ISD, у мышей Balb/C. Через 21 день после первой вакцинации Ad5 (Ad5-MelARV или Ad5-MelARV-ISD) выделяли селезенки мышей Balb/C. Спленоциты стимулировали АН1, и активированные иммунные клетки детектировали по продуцированию IFN γ в анализе ELISPOT. Результат вычисляли как число пятен (IFN γ -продуцирующих клеток) на 10⁶ спленоцитов. Столбики обозначают среднее число пятен в каждой группе (n=5) ± ср. кв.

ош.. Звездочки указывают на значимые различия по сравнению с PBS-контролем, * ($P \leq 0,05$); ** ($P \leq 0,01$); *** ($P \leq 0,001$).

Фигура 10: ICS-анализ Т-клеточных ответов, индуцированных Ad5-MelARV-ISD у мышей Balb/C. Такие же спленциты как и на фигуре 9, были проанализированы на продуцирование цитокинов $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ в Т-клетках по внутриклеточному окрашиванию (ICS) после АН1-стимуляции. Цифры означают общее число активированных ($CD44^+$), $IFN\gamma$ или $TNF\alpha$ -продуцирующих $CD8^+$ -Т-клеток во всей селезенке. (А) $IFN\gamma$ -позитивные $CD8^+$ -Т-клетки. (В) $TNF\alpha$ -позитивные $CD8^+$ -Т-клетки. (С) Суммарное геометрическое среднее для $IFN\gamma$ -продуцирующих $CD8^+$ -Т-клеток у каждой мыши вычисляли исходя из числа $IFN\gamma^+$ - $CD8^+$ -Т-клеток с умноженных результата на среднюю интенсивность флуоресценции для $IFN\gamma^+$ -клеток. (D) Дважды позитивные $CD8^+$ -Т-клетки. Горизонтальными линиями показано среднее для каждой группы. Звездочками показаны значимые различия между группами, * ($P \leq 0,05$); ** ($P \leq 0,01$); *** ($P \leq 0,001$).

Фигура 11: Титр Ad5-специфических антител у Ad5-MelARV- и Ad5-MelARV-ISD-вакцинированных мышей CD1. Мыши CD1 были вакцинированы Ad5-MelARV или Ad5-MelARV-ISD в соответствии со схемой вакцинации IV. Сыворотку крови анализировали с помощью ELISA на Ad5-специфические антитела путем покрытия ELISA-планшетов частицами Ad5. Сыворотку каждой мыши тестировали при серийном разведении 1:2 для получения титра антитела. Пороговое значение для положительного результата в 4 раза превышало фоновую величину OD_{450} . Столбики указывают на средний титр для каждой группы \pm ср. кв. ош.. Группы содержали n=5 мышей. Звездочками показаны значимые различия между группами, * ($P \leq 0,05$); ** ($P \leq 0,01$); *** ($P \leq 0,001$).

Фигура 12: Фрагменты аминокислотных последовательностей p15E, презентированных на аденовирусном белке pIX. Полноразмерные последовательности представлены в списке последовательностей: pIX-p15E (SEQ ID NO: 51); pIX-p15E-ISD (SEQ ID NO: 52), pIX-p15E-Trunc-wC (SEQ ID NO: 53); pIX p15E-trunc-w/oC (SEQ ID NO: 54).

Фигура 13: Характеризация аденовирусных векторов, презентующих рекомбинантный pIX. (А) плазмиды pcDNA3-pIX-Taglinker-xxx, кодирующие рекомбинантный pIX, трансфецировали в клетки HEK293 для подтверждения соответствующей экспрессии. Клеточные лизаты трансфецированных клеток анализировали с помощью Вестерн-блот-анализа с использованием анти-pIX антитела. Дорожка 1) pIX-p15E, дорожка 2) pIX-p15E-ISD, дорожка 3) pIX-p15E_trunc-Wc, дорожка 4) pIX-p15E_trunc-ж/oC, дорожка GFP: pIX-GFP. (В) Полученные и очищенные вирусы анализировали на интеграцию рекомбинантного pIX с помощью Вестерн-блот-анализа с использованием анти-pIX антитела. Номера строк представляют ту же модификацию pIX, как и в (А), представленную на векторе Ad5, а символ \emptyset означает нативный Ad5 без модификации pIX.

Фигура 14: Гуморальные ответы у Ad5-pIX-вакцинированных мышей CD1. (А) pIX-модифицированные вакцины Ad5 (заштрихованные столбики) тестировали у мышей

CD1 (по схеме вакцинации IV) и сравнивали с их немодифицированными аналогами (пустые столбики). Аденовирусы (Ad5-MelARV или Ad5-MelARV-ISD, презентующие нативный или рекомбинантный рIX) тестировали по схеме первичной ДНК-вакцинации, либо ДНК-MelARV, либо ДНК-MelARV-ISD. GFP-вакцинированные мыши служили в качестве негативного контроля. Связывание антител с пептидом трансмембранный субъединицы р15E Env MelARV оценивали на 450 нм и нормализовали на оптическую плотность стандартной контрольной сыворотки LEV76. (B) Те же самые пробы сыворотки, как и в (A), анализировали на связывание с раковыми клетками B16F10-GP. Связывание антител детектировали с использованием APC-конъюгированного «второго» антитела против мышинового IgG с помощью проточной цитометрии и количественно оценивали по средней интенсивности флуоресценции. Контрольная сыворотка LEV76 и только «второе» антитело (только 2.Ab) служили в качестве позитивного и негативного контроля, соответственно. Столбики означают среднее для каждой группы ($n=5$) \pm ср. кв. ош. Звездочками показаны значимые различия между группами, * ($P \leq 0,05$); ** ($P \leq 0,01$); *** ($P \leq 0,001$).

Фигура 15: Гуморальные ответы и число метастазов у Ad5-MelARV_pIX-p15E-вакцинированных мышей C57BL/6. Мышей вакцинировали Ad5-MelARV_pIX-p15E или нативным вариантом этого вируса (Ad5-MelARV) по схеме вакцинации V. GFP-вакцинированные мыши служили в качестве негативного контроля. (A) Гуморальные ответы против опухолевых клеток B16F10-GP в сыворотке вакцинированных мышей анализировали с помощью проточной цитометрии. Контрольная сыворотка LEV76 была включена в качестве позитивного контроля. Опухолевые клетки, инкубированные только со «вторым» антителом (только 2.Ab), служили в качестве негативного контроля. (B) р15E-специфические гуморальные ответы были проанализированы с помощью ELISA. Измеренную оптическую плотность на 450 нм нормализовали на контрольную сыворотку LEV76. Каждая группа в (A) и (B) содержала $n=5$ мышей. Представленные величины означают среднее для каждой группы \pm ср. кв. ош. (C) Число метастазов опухоли у вакцинированных мышей после заражения клетками B16F10-GP. На горизонтальной линии показано среднее для каждой группы. (D) корреляция между B16F10-GP-специфическими антителами и числом метастазов. (E) Корреляция р15E-специфических антител и числа метастазов. Негативный контроль (GFP-контроль) не был включен в расчет корреляции.

Фигура 16: Стратегия улучшения вакцины: химерные белки Env MelARV с функциональными доменами для улучшения презентации на VLP. Две модифицированные вакцины были получены с использованием либо полноразмерного Env MelARV (Ad5-LucSP_MelARV_Ha-TMCT), либо только р15E (Ad5-LucSP_GCN4_p15E_Ha-TMCT). В Ad5-LucSP_MelARV_Ha-TMCT, нативный сигнальный пептид Env MelARV был заменен на сигнальный пептид люциферазы (LucSP). Кроме того, нативный трансмембранный домен и цитоплазматический хвост (TMCT) были заменены на соответствующую последовательность гемагглютинаина H3N2 вируса гриппа

А (НА-ТМСТ). В Ad5-LucSP_GCN4_p15E_НА-ТМСТ, вместо полноразмерного белка Env кодируется только p15E. Аналогичным образом, p15E содержит НА-ТМСТ и LucSP, присоединенные к N-концу. Кроме того, была включена последовательность тримеризации (GCN4).

Фигура 17: Экспрессия Env MelARV на клетках после инфицирования рекомбинантным Ad5, кодирующим химерные белки Env MelARV. Вакцинные вирусы с модифицированными последовательностями Env MelARV (Ad5-LucSP_MelARV_НА-ТМСТ и Ad5-LucSP_GCN4_p15E_НА-ТМСТ) тестировали на экспрессию белка-мишени на инфицированных клетках Vero. Для сравнения результатов были также включены Ad5-MelARV и Ad5-MelARV-ISD. Клетки Vero были инфицированы модифицированными вирусами, и экспрессию белка-мишени на клетках анализировали с использованием различных антител против Env MelARV: (А) 19F8 (анти-p15E антитело, нацеленное на ISD), (В) 4F5 (анти-p15E антитело), (С) MM2-9B6 (анти-gp70 антитело), (D), MM2-3C6 (анти-gp70 антитело), (E) MM2-9A3 (анти-gp70 антитело). Связывание антител с инфицированными клетками детектировали с использованием соответствующих «вторых» антител, связанных с флуоресцентным агентом, с помощью проточной цитометрии. Столбики (с n=1) означают среднюю интенсивность флуоресценции, испускаемой антителами, конъюгированными с флуоресцентным агентом.

Фигура 18: Анализ экспрессии белка-мишени и высвобождения VLP в клетки, инфицированные Ad5, кодирующим химерный Env MelARV (Вестерн-блот-анализ): клетки Vero инфицировали модифицированными вирусами. Клеточные лизаты и высвобождаемые VLP анализировали на экспрессию белка-мишени с помощью Вестерн-блоттинга с использованием различных антител: (А) анти-p2A (Gag MelARV), (В) 4F5 (анти-p15E антитела), (С) MM2-9B6 (анти-gp70 антитела). Кроме того, супернатант инфицированных клеток анализировали с помощью Вестерн-блот-анализа на секрецию p15E (4F5) (D) и gp70 (MM2-9B6) (E). Дорожка 1) Ad5-MelARV, дорожка 2) Ad5-MelARV-ISD, дорожка 3) Ad5-LucSP_GCN4_p15E_НА-ТМСТ, дорожка 4) Ad5-LucSP_MelARV_НА-ТМСТ, дорожка Ø означает вирус в качестве негативного контроля. Ожидаемые размеры полос перечислены в Таблице 6.

Фигура 19: Анализ экспрессии белка-мишени и высвобождения VLP в клетки, инфицированные Ad5, кодирующим химерный Env MelARV (ELISA): клетки Vero инфицировали прототипом и модифицированными вирусами: дорожка 1) Ad5-MelARV, дорожка 2) Ad5-MelARV-ISD, дорожка 3) Ad5-LucSP_GCN4_p15E_НА-ТМСТ, дорожка 4) Ad5-LucSP_MelARV_НА-ТМСТ, дорожка Ø относится к вирусу, используемому в качестве негативного контроля. ELISA-планшеты покрывали клеточным лизатом, супернатантом (SN) или очищенными VLP инфицированных клеток Vero. Наличие белков Env MelARV и Gag MelARV детектировали посредством связывания «первых» антител (анти-P2A антител MM2-9B6, 4F5 и 19F8). (А) анти-P2A антитела выявили экспрессию Gag. (В) Связывание MM2-9B6 указывало на экспрессию субъединицы gp70 поверхности Env MelARV. (С), (D) 4F5 и 19F8 (ISD-связывающиеся), связанные с трансмембранной

субъединицей p15E.

Фигура 20: Показано сравнение с ISD-антителами против ВИЧ.

Фигура 21: Показано сравнение для ISD-T-клеток, содержащих ВИЧ, в которых присутствуют

- HIVB_{gagP2AConBgp140G/CDVSVCT}
- HIVB_{gagP2AConBgp140G/CDISD#4VSVCT}
- ▲ HIVB_{gagP2AConBgp140G/CDISD#19VSVCT}
- ◆ HIVB_{gagP2AConBgp140G/CDG19R(db mut)VSVCT}

Фигура 22: Стратегия для улучшения конструкции вакцины: точковая мутация в домене ISD (p15E) белка Env HERV-K, кодируемого в вакцине. Глутамин (Q) (см. «Ad19_HERV-K»; кодирующая последовательность, представленная в SEQ ID № 43) заменяли аланином (A) («HERV-K-ISD»; кодирующая последовательность, представленная в SEQ ID NO: 44) для инактивации домена ISD, который опосредует иммуносупрессорный эффект. Эта фигура представлена с изменениями (Mangeneu et al. 2007).

Фигура 23: Детектирование белков Env и Gag HERV-K (VLP), выделенных из супернатанта (SN) и клеточного лизата клеток, трансфецированных вирусом. Наличие функциональных белков Gag (A) и Env (B) в SN и клеточном лизате Ad19_HERV-K WT/ISDmut- трансфецированных клеток A549 и VERO, отмечено цветом в квадратных рамках. Молекулярные массы приблизительно 90, 80 и 40 кДа были эквивалентны молекулярным массам Gag HERV-K, полноразмерного непротессированного предшественника Env HERV-K (в присутствии и в отсутствии сигнального пептида) и HERV-K p15E (TM, ENV), составляющим 80, 90, 80 и 42 кДа, соответственно, как показано в следующей таблице:

Белок	Молекулярная масса [кДа]	Литература
Gag MelARV	65	(Andrawiss et al. 2003)
Предшественник Env MelARV (нерасщепленный)	85	(Opstelten et al. 1998) [45]
Env MelARV	100	(Opstelten et al. 1998) [45]
MelARV gp70 (SU, Env)	70	(Opstelten et al. 1998) [45]
MelARV p15E(TM, Env)	15	(Opstelten et al. 1998) [45]

Gag HERV-K	80	(Tönjes et al. 1999).
Предшественник Env HERV-K (нерасщепленный) Полноразмерный непроцессированный предшественник	90 (с сигнальным пептидом) 80 (без него)	
HERV-K gp70 (SU, Env) негликозилированные белки	68	(Dewannieux et al. 2005)
HERV-K p15E(TM, Env) негликозилированные белки	42	(Dewannieux et al. 2005)

Кроме того, белок Ad5_MelARV_Gag (65 кДа) был также обнаружен в клеточном лизате и в супернатанте обеих клеточных линий (A1 и A2), а это означает, что оба белка Gag HERV-K и MelARV могут распознаваться тем же самым кроличьим поликлональным анти-p2A антителом.

Фигура 24: Экспрессия Env HERV-K внутри клеток и на их поверхности после Ad19_HERV-K_WT/ISDmut-трансфекции. Антитело HERM-1811 было использовано для выявления продуцирования и присутствия белка Env HERV-K внутри клеток и на клеточной поверхности инфицированных клеток A549. Клетки, инфицированные Env Ad19_HERV-K дикого типа (прозрачный умеренно серый)/ISDmut (прозрачный темно-серый), экспрессируют большое количество Env HERV-K, тогда как клетки, инфицированные вектором Ad5, кодирующим Env HERV-K (прозрачный очень светлый, серый), показали более низкую экспрессию белка-мишени, что позволяет предположить, что трансфекция Ad19 может быть более эффективной, чем трансфекция Ad5. Клетки, инфицированные нерелевантным антигеном, кодируемым вектором Ad19 (светло-серый), совпадают с неинфицированными клетками (темно-серый) и таким образом не обнаруживают какого-либо сигнала.

Фигура 25: ICS-анализ CD8⁺-Т-клеточных ответов, вырабатываемых Ad19-HERV-K у мышей BALB/C. Числа означают общее количество активированных (CD44⁺) CD8⁺-Т-клеток, секретирующих TNF α и содержащихся в селезенке каждой мыши. (A) Число IFN γ -позитивных CD8⁺-Т-клеток иммунизированных мышей, которым вводили различные ADV-вакцины (по схеме «прайм-буст») с последующей вакцинацией без введения бустер-дозы (Ø) и схемы введения бустер-дозы MVA_Env. (B) Процент CD8⁺-Т-клеток, позитивных по IFN γ и TNF α . (C) Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) IFN γ -позитивных CD8⁺-Т-клеток. Среднее для мышей каждой группы показано горизонтальными линиями. Звездочками показаны значимые различия между группами, * (P \leq 0,05); ** (P \leq 0,01); *** (P \leq 0,001).

Фигура 26: Кривая выживаемости мышей, зараженных опухолями и подвергнутых терапевтической вакцинации. Эффективность полученных авторами вакцин Ad19_HERV-K WT/ISDmut (умеренно серый и темно-серый) в отношении снижения или предотвращения роста опухоли и развития метастазов тестировали у мышей BALB/C, зараженных клетками RENCA, экспрессирующими белок-мишень Env HERV-K. Вакцины согласно изобретению сравнивали с нерелевантной вакциной, которая не экспрессировала HERV-K (черный), а также с вакциной MVA, которая экспрессировала белок-мишень (светло-серый). Легкие мышей, умерщвленных на 40-й день (конечная точка), подвергали ранжированию слепым методом для оценки прогрессирования метастазов в легкие. Для оценки выживаемости различных групп вакцинированных мышей применяли метод Каплана-Мейера. Кривые выживаемости сравнивали с использованием различных статистических критериев (логрангового критерия, критерия Уилкосона и критерия Тарона-Вэйя), и эти кривые рассматривались как статистически значимые (*), если p -величина $< 0,05$.

Фигура 27. Стратегия стробирования. Проиллюстрированы черные строб-импульсы, показанные стрелками, где группы были использованы для стробирования на соответствующих графиках. На этой фотографии показан позитивный результат для мышей BALB/c, иммунизированных вакциной на основе Adv (путем первичной вакцинации) + Env MVA (путем бустер-вакцинации).

Фигура 28. HERV-K-окрашивание ткани рака молочной железы человека (H841). Образцы тканей получали из опухоли молочной железы человека. Эти образцы разрезали на части толщиной 4 мкм и окрашивали разведенными 1:1000 первыми антителами, полученными от (A) неиммунизированных мышей (перед забором сыворотки крови) и (B) Ad5_HERV-K_Env-примированных мышей, которым вводили бустер-дозу Ad19_HERV-K_ISD (через 8 недель) и MVA_Env (через 2 месяца) по схеме вакцинации. Затем использовали разведенное 1:500 и меченное биотином антимышиное «второе» антитело, и в конечном счете, раковые клетки окрашивали гематоксилином/эозином. HERV-K-специфическое окрашивание (темно-серый) четко визуализировалось на правом гистологическом предметном стекле, в результате чего было подтверждено, что высокие титры антител против HERV-K от вакцинированных мышей обладали способностью окрашивать раковую ткань, экспрессирующую белок-мишень HERV-K.

Фигура 29: Морфология VLP, секретлируемых трансфицированными клетками. Клетки A549 трансфицировали Ad19a-HERV-K ISDmut, кодирующими белки Gag_p2A_Env. Клетки фиксировали через 24 часа, и наблюдали высвобождаемые VLP (кружки размером приблизительно 100 нм) с использованием просвечивающего электронного микроскопа.

Подробное описание

Ниже представлены нативные последовательности, в которых присутствуют отдельные элементы последовательностей, описанные ниже:

Сигнальный пептид

Поверхностная субъединица

Трансмембранная субъединица

Иммуносупрессорный домен (ISU/ISD) *

Трансмембранный домен

Цитоплазматический хвост

Настоящее изобретение охватывает нижеупомянутые последовательности, в которых одна, две или более аминокислот в иммуносупрессорном домене заменены другой природной аминокислотой.

1. HERV-K108 (=ERVК-6), имеющая аминокислотную последовательность белка Env (SEQ ID NO: 9):

MNPSEMQRKAPPRRRRHRNRAPLTHKMNMVVTSEEQMKLPSTKKAEPPTWAQ
LKKLTQLA
TKYLENTKVTQTPESMMLLAALMIVSMVVSLPMPAGAAAANYTYWAYVVPFPLIR
 AVTWMD
 NPTEVYVNDVWVPGPIDDRCPAKPEEEGMMINISIGYHYPPICLGRAPGCLMPA
 VQNWL
 VEVPTVSPICRFTYHMOVSGMSLRPRVNYLQDFSYQRSKFRPKGKPCPKKEIPKES
 KNTEV
 LVWEECVANSAVILQNNEFGTIIDWAPRGQFYHNCSGQTQSCPSAQVSPAVDSD
 LTESLD
 KHKHKKLQSFYPWEWGEKGISTRPKIVSPVSGPEHPPELWRLTVASHHIRIWSGN
 QTLET
 RDRKPFYTIDLNSSLTVP LQSCVKPPYMLVVG NIVIKPDSQTITCENCRL LTCIDST
 FNW
 QHRILLVRAREGVWIPVSM DRPWEASPSVHILTEVLKGV LNRSKR FIFTLIAVIMG
LIAV
TATAAVAGVALHSSVQSVNFVNDWQKNSTR L WNSOSSIDQKLANQINDLRQT
VIWMGDRL
MSLEHRFQLQCDWNTSDFCITPQIYNESEHHWDMVRRHLOGREDNLTLDISK LK
EQIFEA
SKAHLNLVPGTEAIAGVADGLANLNPVTWVKTIGSTTIINLILVCLFCLLLVCRCT
QQ
LRRDSDHRERAMMTMAVLSKRKGGNVGKSKRDQIVTVSV

и белок Gag, имеющий аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 10):

MGQTKSKIKSKYASYLSFIKILLKRGGVK VSTKNLIKLFQIIEQFCPWFPEQGTLDL
 KDW
 KRIGKELKQAGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQTEEDSVSVSDAPGSCIIDCN
 ENTR
 KKSQKETEG LHCEYVAEPVMAQSTQNV DYNQLQEVIYPETLKLEGKGP ELVGPS
 ESKPRG

TSPLPAGQVPVTLQPQKQVKENKTQPPVAYQYWPPAELQYRPPPEQYGYPGMP
PAPQGR

APYPQPPTRRNLNPTAPPSRQGSKLHEIIDKSRKEGDTEAWQFPVTLEPMPPGEGA
QEGEP

PTVEARYKSFSIKKLDKDMKEGVKQYGPNSPYMRTLLDSIAHGHRLIPYDWEILAK
SSLSP

SQFLQFKTWWIDGVQEQVRRNRAANPPVNIDADQLLGIGQNWSTISQQALMQN
EAIEQVR

AICLRAWEKIQDPGSTCPSFNTVRQGSKEPYPDFVARLQDVAQKSIADKARKVI
VELMA

YENANPECQSAIKPLKGVKVPAGSDVISEYVKACDGIGGAMHKAMLMAQAITGV
VLGGQVR

TFGRKCYNCGQIGHLKKNCVPLNKQNITIQATTTGREPPDLCPRCKKKGKHWASQ
CRSKFD

KNGQPLSGNEQRGQPAPQQTGAFFIQPFVPPQGFQGGQPPLSQVFQGISQLPQYN
NCPPP

QAAVQQ

2. ERVK-19, имеющий аминокислотную последовательность белка Env (SEQ ID
No. 11):

MNPSEMQRKAPPRRRRHRNRAPLTHKMNMVTSEEQMKLPSTKKAEPPTWAQ
LKKLTQLA

TKYLENTKVTQTPESMLLAALMIVSMVVSLPMPAGAAAANYTYWAYVVPFPLIR
AVTWMD

NPIEVYVNDVWVPGPTDDHCPAKPEEEGMMINISIGYRYPPICLGRAPGCLMPA
VQNWL

VEVPTVSPISRFTYHMOVSGMSLRPRVNYLQDFSYQRSFKFRPKGKPCPKEIPKESK
NTEV

LWEECVANSVILQNNFEGTIIDWAPRGQFYHNCSGQTQSCPSAQVSPAVDSD
LTESLD

KHKHKKLQSFYPWEWGEKGISTPRPKIISVSGPEHPELWRLTVASHHIRIWSGN
QTLET

RDRKPFYTVDLNSSVTVPLQSCIKPPYMLVVGIVIKPDSQTITCENCRLLTCIDST
FNW

QHRILLVRAREGVWIPVSMDRPWETSPSIHTLTEVLKGVLNRSKRFIFTLIAVIMG
LIAV

TATAAVAGVALHSSVQSVNFVNDWQKNSTRWNSOSSIDQKLANQINDLRQT
VIWMGDRL

MSLEHRFQLQCDWNTSDFESITPQIYNESEHHWDMVRRHLOGREDNLTLDISKLK
EQIFEA

SKAHLNLVPGTEAIAGVADGLANLNPVTWVKTIGSTTIINLILVCLFCLLLVCRC

TQQLRRDSDHRERAMMTMAVLSKRKGGNVGKSKRDQIVTVSV

и белок Gag, имеющий аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 12):

MGQTKSKIISKYASYLSFIKILLKRGGVKVVSTKNLIKLFQIIEQFCPWFPEQGTLDL
 KDW
 KRIGKELKQAGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQTEEDSVSVSDAPGSCIIDCN
 ENTR
 KKSQKETESLHCEYVAEPVMAQSTQNVQNLQEVYIPETLKLEGKVPPELVGPS
 ESKPRG
 TSRLPAGQVPVTLQPQTQVKENKTQPPVAYQYWPPAELQYRPPLESQYGYPGMP
 PAPQGR
 APYPQPPTRRLNPTAPPSRRGSELHEIDKSRKEGDTEAWQFPVTLEPMPPGEGAQ
 EGEP
 PTVEARYKSFSIKMLKDMKEGVKQYGPNSPYMRTLDSIAHGHRLIPYDWEILA
 KSSLSP
 SQFLQFKTWWIDGVQEQVRRNRAANPPVNIDADQLLGIGQNWSTISQQALMQN
 EAIEQVR
 AICLRAWEKIQDPGSTCPSFNTVRQGSKEPYPDFVARLQDVAQKSIAIEKARKVIV
 ELMA
 YENPNPECQSAIKPLKGVKVPAGSDVISEYVKACDGMGGAMHKAMLMAQAITGV
 VLGGQVR
 TFGGKCYNCGQIGHLKKNCVPLNKQNITIQATTTGREPPDLCPRCKKGKHWASQ
 CRSKFD
 KNGQPLSGNEQRGQPQAPQQTGAFFIQPFVPHGFQGGQPPLSQVFGISQLPQYN
 NCPPP
 QAAVQQ

3. HERV-K115 (=ERVK-8), имеющий аминокислотную последовательность белка Env (SEQ ID No. 13):

MNPSEMQRKAPRRRRHRNRAPLTHKMNMVVTSEEOMKLPSTKKAEPPTWAQ
LKKLTQLA
TKYLENTKVTQTPESMMLLAALMIVSMVVSLPMPAGAAVANYTNWAYVVPFPLIR
 AVTWMD
 NPIEVYVNDVWVPGPIDDRCPAKPEEEGMMINISIGYRYPPICLGRAPGCLMPA
 VQNWL
 VEVPTVSPISRFTYHMOVSGMSLRPRVNYLQDFSYQRSKFRPKGKPCPKKEIPKESK
 NTEV
 LWEECVANSVILQNNFEGTIIDWAPRGQFYHNCSGQTQSCPSAQVSPAVDSD
 LTESLD
 KHKHKKLQSFYPWEWGEKRISTPRPKIVSPVSGPEHPPELWRLTVASHHIRIWSGN
 QTLET

RDRKPFYTVDLNSSLTPLQSCVKPPYMLVVGNIKPKDSQTITCENCRLLCIDS
 TFNW
 QHRILLVRAREGVWIPVSMRDPWEASPSVHILTEVLKGVLNRSKRFIFTLIAVIMG
LIAV
TATAAVAGVALHSSVQSVNFVNDGQKNSTRLWNSQSSIDOKLANQINDLRQTV
IWMGDRL
MSLEHRFQLOCDWNTSDFCITPOIYNDSEHHWDMVRRHLOGREDNLTLDISKLK
EQIFEA
SKAHLNLVPGTEAIAGVADGLANLNPVTWVKTIGSTTIINLILVCLFCLLLVCRC
TQQ
LRRSDHRERAMMTMAVLSKRKGGNVGKSKRDQIVTVSV
 и белок Gag, имеющий аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 14):
 MGQTKS~~IK~~SKYASYLSFIKILLKRGGVK~~V~~STKNLIKLFQIEQFC~~P~~WFPEQGTLDL
 KDW
 KRIGKELKQAGRKGNIPLTVWNDWAIKAAL~~E~~PFQTEEDSISVSDAPGSC~~L~~IDCN
 ENTR
 KKSQKETESLHCEYVAEPVMAQSTQNV~~D~~YNQLQEVIYPETLKLEGKGP~~E~~LVGPS
 ESKPRG
 TSPLPAGQVPVTLQPQKQVKENKTQPPVAYQYWPPAELQYRPP~~P~~ESQYGYPGMP
 PAPQGR
 EPYPQPTRRLNPTAPPSRQGS~~E~~LHEIIDKSRKEGDTEAWQFPVTLEPMPPGEGAQ
 EGEP
 PTVEARYKSFSIKMLKDMKEGVKQYGPNSPYMRTLLDSIAHGHRLIPYDWEILA
 KSSLSP
 SQFLQFKTWWIDGVQE~~V~~RRNRAANPPVNIDADQLLGIGQNWSTISQQALMQN
 EAIEQVR
 AICLRAW~~E~~KIQDPGSTCPSFNTVRQGSKEPYPDFVARLQDVAQKSI~~A~~DEKARKVI
 VELMA
 YENANPECQSAIKPLK~~G~~KVPAGSDVISEYVKACDGIGGAMHKAMLMAQAITGV
 VLG~~G~~QVR
 TFGGKCYNCGQIGHLKKNCPVLNKQNITIQATTTGREPPDLCPRCKK~~G~~KHWASQ
 CRSKFD
 KNGQPLSGNEQRGQPQAPQQTGAFFIQPFV~~P~~QGFQDNNPHCPKCFRE
 4. ERVK-9, имеющий аминокислотную последовательность *белка Env* (SEQ ID No.
 15):
MNPSEMQRKAPPRRRRHRNRAPLTHKMNMVMTSEEQMKLPSTKKAEPPTWAQ
LK~~K~~L~~T~~QLA
TKYLENTKVTQTPE~~S~~MLLAALMIVSMV~~V~~SLPMPAGAAAANYTNWAYVVPFPLIR
 AVTWMD
 NPIEVYVND~~S~~VWVPGPIDDRCPAKPEEEGMMINISIGYRYPICLGRAPGCLMPAV

QNLV

EVPIVSPICRFTYHMOVSGMSLRPRVNYLQDFSQYRSLKFRPKGKPCPKKEIPKESKN

TEVL

VWEECVANSAVILQNNFGTIIDWTPQGQFYHNCSGQTQSCPSAQVSPAVIDSDL

TESLDK

HKHKKLQSFYPWEWGEKGIPTPRPKIISPVSGPEHPELWRLTVASHHIRIWSGNQT

LETR

DRKPFYTVDLNSSLTLPLQSCVKPPYMLVVGIVIKPDSQTITCENCRLITCIDSTF

NWQ

HRILLVRAREGVWIPVSMRDPWEASPSIHILTEVLKGVLNRSKRFIFTLIAVIMGLIAVTATAAVAGVALHSSVQSVNFVNDGQKNSTRWNSQSSIDOKLANQINDLRQTVIWMGDRLMSLEHRFQLOCDWNTSDFCITPOIYNESEHHWDMVRRHLOGREDNLTLDISKLKEQIFEASKAHLNLVPGTEAIAGVADGLANLNPVTWVKTIGSTTIINLILVCLFCLLVCRCTQQLRRDSDHRERAMMTMAVLSKRKGGNVGKSKRDQIVTVSV

и аминокислотную последовательность белка Gag (SEQ ID NO:16):

MGQTKSKIKSKYASYLSFIKILLKRGGVKVVSTKNLIKLFQIIEQFCPWFPEQGTLDL

KDW

KRIGKELKQAGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQTEEDSISVSDAPGSGIICNE

KTR

KKSQKETESLHCEYVAEPVMAQSTQNVQYNQLQEVYIPETLKLEGKGPVLP

ESKPRG

TSPLPAGQVPVTLQPQKQVKENKTQPPVAYQYWPPAELQYRPPESQYGYPGMP

PAPQGR

APYPQPPTRLNPTAPPSRQGSSELHEIIDKSRKEGDTEAWQFPVTLEPMPPGEGAQ

EGEP

PTVEARYKSFSIKILKDMKEGVKQYGPNSPYMRTLLDSIAHGHRLIPYDWEILAK

SSLSP

SQFLQFKTWWIDGVQEQVRRNRAANPPVNIDADQLLGIGQNWSTISQQALMQN

EAIEQVR

AICLRAWEKIQDPGSTCPSFNTVRQGSKEPYPDFVARLQDVAQKSIADKARKVI

VELMA

YENANPECQSAIKPLKGVKVPAGSDVISEYVKACDGIGGAMHKAMLMAQAITGV

VLGGQVR

TFGGKCYNCGQIGHLKKNCVNLKQNTIQATTTGREPPDLCPRCKKGKHWASQ

CRSKFD

KNGQPLSGNEQRGQPQAPQQTGAFFIQPFVPPQGFQGGQPPLSQVFGISQLPQYN

NCPPP

QVAVQQ

5. HERV-K113, имеющий аминокислотную последовательность белка Env (SEQ ID No. 17):

MNPSEMQRKAPRRRRHRNRAPLTHKMNMVTSEEQMKLPSTKKAEPPTWAQ
LKKLTQLA
TKYLENTKVTQTPESMLLAALMIVSMVVSLPMPAGAAAANYTYWAYVFPPLIR
 AVTWMD
 NPIEIVNDSVWVPGPTDDCCPAKPEEEGMMINISIGYRYPPICLGRAPGCLMPAV
 QNWL
 VEVPTVSPISRFTYHMOVSGMSLRPRVNYLQDFSYQRSKFRPKGKPCPKKEIPKESK
 NTEV
 LVWEECVANSAVILQNEFGTLIDWAPRGQFYHNCSGQTQSCPSAQVSPAVDSD
 LTESLD
 KHKHKKLQSFYPWEWGEKGISTARPKIISVSGPEHPELWRLTVASHHIRIWSGN
 QTLET
 RDRKPFYTIDLNSSLTVP LQSCVKPPYMLVVG NIVIKPDSQTITCENCRL LTCIDST
 FNW
 QHRILLVRAREGVWIPVSM DRPWEASPSVHILTEVLKGV LNRSKR FIFTLIAVIMG
LIAV
TATAAVAGVALHSSVQSVNFVNDWQNNSTRLWNSOSSIDOKLANOINDLRQT
VIWMGDRL
MSLEHRFQLOCDWNTSDFCITPOIYNESEHHWDMVRCHLOGREDNLTLDISKLK
EQIFEA
SKAHLNLVPGTEAIAGVADGLANLNTVTWVKTIGSTTIINLILVCLFCLLVYRC
TOQ
LRRDSHDRERAMMTMVVLSKRKGGNVGKSKRDQIVTVSV

и аминокислотную последовательность белка Gag (SEQ ID No.18):
 MGQTKSKIKSKYASYLSFIKILLKRGGVK VSTKNLIKLFQIIEQFCPWFPEQGTLDLKD W
 KRIGKELKQAGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQTEEDSVSVSDAPGSCIIDCN
 EKTR
 KKSQKETESLHCEYVAEPVMAQSTQNADYNQLQEVIYPETLKLEGKGP ELMGPS
 ESKPRG
 TSPLPAGQVPVTLQPQKQVKENKTQPPVA YQYWPPAELQYQPPPE SQYGYPGMP
 PAPQGR
 APYPQPPTRRLNPTAPPSRQGS E LHEIIDKSRKEGDTEAWQFPVTLELMPPGEGAQ
 EGEP
 PTVEARYKSFSIKMLKDMKEGVKQYGPNSPYMRTL LDSIAHGHRLIPYDWEILA
 KSSLSP
 SQFLQFKTWWIDGVQEQRNRANPPVNIDADQLLGIGQNWSTISQQALMQN

EAIEQVR

AICLRAWEKIQDPGSTCPSFNTVRQGSKEPYPDFVARLQDVAQKSIADKARKVI

VELMA

YENANPECQSAIKPLKGGKVPAGSDVISEYVKACDGMGGAMHKAMLMAQAITG

VVLGGQVR

TFGGKCYNCGQIGHLKKNCVNLKQNITIQATTTGREPPDLCPRCKKGGKHWASQ

CRSKFD

KNGQPLSGNEQRGQPQAPQQTGAFFIQPFVPPQGFQGGQPPLSQVFQGISQLPQYN

NCPPP

QAAVQQ

6. ERVK-21, имеющий аминокислотную последовательность белка Env (SEQ ID No. 19):

MHPSEMQRKAPRRRRHRNRAPLTHKMNMVTSEOMKLPSTKKAEPPTWAQL

KKLTQLAT

KYLENTKVTQTPESMLLAALMIVSMVVSLLPMPAGAAAANYTNWAYVVPFPLIR

AVTWMDN

PIEVYVNDVWVHGPIDDRCPAKPEEEGMMINISIGYHYPPICLGRAPGCLMPAV

QNWLV

EVPTVSPISRFTYNMVSGMSLRPRVNYLQDFSYQRSKFRPKGKPCPKKEIPKESKN

TEVL

VWEECVANSVVILQNNEFGTIIDWAPRGQFYHNCSGQTQSCPSAQVSPAVDSDL

TESLDK

HKHKKLQSFYPWEWGEKGISTPRPKIISPVSGPEHPELWRLTVASHHIRIWSGNQT

LETR

DRKPFYTVDLNSSLTVPLQSCVKPPYMLVVGNIKPKDSQTITCENCRLTLCIDST

FNWQ

HRILLVRAREGVWIPVSMDRPWEASPSIHILTEVLKGVLNRSKRFIFTLIAVIMGLI

AVT

AMAAVAGVALHSFVQSVNFVNDWQKNSTRWNSQSSIDOKLANOINDLRQTV

IWMGDRLM

SLEHRFQLOCDWNTSDFCITPOIYNESEHHWDMVRRHLOGREDNLTLDISKLKE

QIFEAS

KAHLNLVPGTEAIAGVADGLANLNPVTWVKTIGSTTIINLILVCLFCLLLVCRCT

QQL

RRDSDHRERAMMTMVVLSKRKGGNVGKSKRDQIVTVSV

и имеющий аминокислотную последовательность белка Env (SEQ ID No. 20):

MGQTKSIIKSKYASYLSFIKILLKRGGVKVVSTKNLIKLFQIIEQFCPWFPEQGTLDL

KDW

KRIGKELKQAGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQTEEDSISVSDAPGSCIHCNE

NTR

KKSQKETEGHCEYAAEPVMAQSTQNVQDYNQLQEVIYPETLKLEGKGPPELVGPS
ESKPRG

TSPLPAGQVPVTLQPQTQVKENKTQPPVAYQYWPPAELQYRPPPEQYGYPGMP
PAPQGR

APYPQPTRRLNPTAPPSRQGSSELHEIIDKSRKEGDTEAWQFPVMLEPMPPGEGA
QEGEP

PTVEARYKSFSIKMLKDMKEGVKQYGPNSPYMRTLSDIAHGHRLIPYDWEILA
KSSLLP

SQFLQFKTWWIDGVQEQVQRNRAANPPVNIDADQLLGIGQNWSTISQQALMQN
EAIEQVR

AICLRAWEKIQDPGSTCPSFNTVRQSSKEPYPDFVARLQDVAQKSIADKARKVI
VELMA

YENANPECQSAIKPLKGVKVPAGSDVISEYVKACDGIGGAMHKAMLMAQAITGV
VLGGQVR

TFGGKCYNCGQIGHLKKNCPVLNKQNITIQATTTGREPPDLCPRCKKGKHWASQ
CRSKFD

KNGQPLSGNEQRGQPQAPQQTGAFFIQPFVPPQGFQGGQPPLSQVFQGISQLPQYN
NCPPP

QAAVQQ

7. ERVK-25, имеющий аминокислотную последовательность белка Env (SEQ ID
No. 21):

MNPSEMQRKAPPRRRRHRNRAPLTHKMNMVTSEEOMKLPSTKKAEPPTWAQ
LKKLTQLA

TKYLENTKVTQTPESMMLLAALMIVSMVVSLLPMPAGAAAANYTYWAYVVPFPLIR
AVTWMD

NPIEVYVNDVWVPGPIDDRCPAKPEEEGMMINISIGYRYPPICLGTAPGCLMPAV
QNWL

VEVPIVSPISRFTYHMOVSGMSLRPRVNYLQDFSQYRSLKFRPKGKPCPKEIPKESK
NTEV

LWEECVANSVILQNNFEGTIIDWAPRGQFYHNCSGQTQSCPSAQVSPAVDSD
LTESLD

KHKHKKLQSFYPWEWGEKGISTPRPKIVSPVSGPEHPPELWRLTVASHHIRIWSGN
QTLET

RDRKPFYTVDLNSSLTVPLQSCVKPPYMLVVGNIKPKDSQTITCENCRLLTCIDS
TFNW

QHRILLVRAREGVWIPVSMRDPWEASPSIHILTEVLKGVLNRSKRFIFTLIAVIMG
LIAV

TATGAVAGVALHSSVQSVNFVNDWQKNSTRLLWNSOSSIDQKLANQINDLRQT
VIWMGDRL

MSLEHRFQLQCDWNTSDFCITPQIYNESEHHWDMVRRHLQGREDNLTLDISKLK

EQIFKASKAHLNLVPGTEAIAGVADGLANLNPVTWVKTIGSTTIINLILVCLFCLLLVCRCTQQL

8. HERV-K102=ERVK-7, имеющий аминокислотную последовательность *белка Env* (SEQ ID No. 22):

MVTPVTWMDNPIEIYVNDVWVPGPIDDRCPAKPEEEGMMINISIGYRYPPICLG
RAPGC

LMPAVQNWLVEVPTVSPISRFTYHMOVSGMSLRPRVNYLQDFSYQRSLKFRPKGK
PCPKEI

PKESKNTEVLVWEECVANSVILQNNFEGTIIDWAPRGQFYHNCSGQTQSCPSA
QVSPAV

DSDLTESLDKHKHKKLQSFYPWEWGEKRISTPRPKIVSPVSGPEHPELWRLTVAS
HHIRI

WSGNQTLETRDCKPFYITIDLNSSLTVPLQSCVKPPYMLVVGIVIKPDSQTITCEN
CRLI

SCIDSTFNWQHRILLVRAREGVWIPVSMGRPWEASPSVHILTEVLKGVLNRSKRE

IFTLIAVIMGLIAVTATAAVAGVALHSSVQSVNFVNDWQKNSTRLLWNSQSSIDQKLANQINDLRQTVIWMGDRLMSLEHRFOLQCDWNTSDFCITPQIYNESEHHWDMVRRHLOGREDNLTLDISKLKEQIFEASKAHLNLVPGTEAIAGVADGLANLNPVTWVKTIGSTTIINLILVCLFCLLLVCRCTQQLRRDSDHRERAMMTMAVLSKRKGGNVGKSKRDOIVTVSV

и имеющий аминокислотную последовательность *белка Gag* (SEQ ID No. 23):

MGQTKSKIKSKYASYLSFIKILLKRGGVKVVSTKNLIKLFQIIEQFCPWFPEQGTLDL
KDW

KRIGKELKQAGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQTEKDSVSVSDALGSCIIDCN
ENTR

KKSQKETEGHCEYVAEPVMAQSTQNVQDYNQLQEVYIPETLKLEGKGPPELVGPS
ESKPRG

TSHLPAGQVPVTLQPQKQVKENKTQPPVAYQYWPPAELQYRPPESQYGYPGM
PPAPQGR

APYPQPPTRRNLNPTAPPSRQGSSELHEIIDKSRKEGDTEAWQFPVTLEPMPPGEGAQ
EGEP

PTVEARYKSFSIKMLKDMKEGVKQYGPNSPYMRTLDSIAHGHRLIPYDWEILA
KSSLSP

SQFLQFKTWWIDGVQEQVRRNRAANPPVNIDADQLLGIGQNWSTISQQALMQN
EAIEQVR

AICLRAWEKIQDPGSTCPSFNTVRQGSKEPYPDFVARLQDVAQKSIADKARKVI
VELMA

YENANPECQSAIKPLKGVKVPAGSDVISEYVKACDGIGGAMHKAMLMAQAITGV
VLGGQVR

TFGGKCYNCGQIGHLKKNCPVLNKQNITIQATTTGREPPDLCPRCKKGKHWASQ
CRSKFD

KNGQPLSGNEQRGQPQAPQQTGAFFIQPFVPPQGFQEQPPLSQVFQGISQLPQYN
NCPPP

QAAVQQ

9. HERV-K101=ERVK-24, имеющий аминокислотную последовательность *белка*
Env (SEQ ID No. 24):

MVTPVTWMDNPIEVVNDSEWVPGPTDDRCPAKPEEEGMMINISIGYRYPPICL
GTAPGC

LMPAVQNWLVEVPIVSPISRFTYHMOVSGMSLRPRVNYLQDFPYQRSCLKFRPKGK
PCPKEI

PKESKNTEVLVWEECVANSAVILQNNFEGTIIDWAPRGQFYHNCSGQTQSCPSA
QVSPAV

DSDLTESLDKHKHKKLQSFYPWEWGEKGIPTPRPKIISPVSQPEHPPELWRLTVAS
HHIRI

WSGNQTLERDRKPFYTVDLNSSLTPLQSCVKPPYMLVGNIVIKPDSQTITCE
NCRL

TCIDSTFNWQHRILLVRAREGVWILVSMRDPWEASPSVHILTEVLKGVLNRSKRF
IFTLI

AVIMGLIAVTATGAVAGVALHSSVQSVNFVNDWQKNSTRLWNSQSSIDOKLAN

QINDLRQ

TVIWMGDRLMSLEHRFOLQCDWNTSDFCITPQIYNESEHHWDMVRHHLOGRED

NLTLDIS

KLKEQIFEASKAHLNLVPGTEAIAGVADGLANLNPVTWVKTIGSTTIINLILILVCLF

CL

LLVCRCTQQLRRDSDHRERAMMTMAVLSKRKGGNVGKSKRQIIVTVSV

и имеющий аминокислотную последовательность *белка* Gag (SEQ ID No.25):

MGQTKSKIKSKYASYLSFIKILLKRGGVKVVSTKNLIKLFQIIEQFCPWFPEQGTLDL
KDW

KRIGKELKQAGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQTEEDSVSVSDAPGSCLIDCN
EKTR

KKSQKETESLHCEYVAEPVMAQSTQNVNDYNQLQEVIYPETLKLEGKGPPELVGPS
ESKPRG

TSPLPAGQVPVTLQPQKQVKENKTQPPVAYQYWPPAELQYRPPPEQYGYPGMP
PAPQGR

APYPQPPTRRLNPTAPPSRQGSSELHEIIDKSRKEGDTEAWQFPVTLEPMPPGEGAQ

EGEP

PTVEARYKSFSIKMLKDMKEGVKQYGPNSPYMRTLSDSIAYGHRLIPYDWEILA
KSSLSP

SQFLQFKTWWIDGVQEQVRRNRAANPPVNIDADQLLGIGQNWSTISQQALMQN
EAIEQVR

AICLRAWEKIQDPGSACPSFNTVRQGSKEPYPDFVARLQDVAQKSIADKARKVI
VELMA

YENANPECQSAIKPLKGGKVPAGSDVISEYVKACDGIGGAMHKAMLMAQAITGV
VLGGQVR

TFGGKCYNCGQIGHLKKNCVNLKQNTIQATTTGREPPDLCPRCKKGGKHWASQ
CRSKFD

KNGQPLSGNEQRGQPQAPQQTGAFFIQPFVPPQGFQGGQPPLSQVFGISQLPQYN
NCPLP

QAAVQQ

10. HERV-K110=ERVK-18, имеющий аминокислотную последовательность белка
Env (SEQ ID No. 26):

MVTPVTWMDNPIEVVYVNDVWVPGPTDDRCPAKPEEEGMMINISIGYHYPPICL
GRAPGC

LMPAVQNWLVEVPTVSPNSRFTYHMSVSGMSLRPRVNCLQDFSYQRSKFRPKG
KTCPKEI

PKGSKNTEVLVWEECVANSVVLQNEFGTIIDWAPRGQFYHNCSTGQTQSCPSA
QVSPAV

DSDLTESLDKHKHKKLQSFYLWEWEEKGISTPRPKIISPVSGPEHPELWRLTVAS
HHIRI

WSGNQTLETRYRKPFYTIDLNSILTVPLQSCVKPPYMLVGNIVIKPASQTITCEN
CRLF

TCIDSTFNWQHRILLVRAREGMWIPVSTDRPWEASPSIHILTEILKGVLNRSKRFI
TLI

AVIMGLIAVTATAAVAGVALHSSVQSVNFVNYWQKNSTRLLWNSQSSIDOKLAS

QINDLRQ

TVIWMGDRLMTLEHHFQLOCDWNTSDFCITPQIYNESEHHWDMVRRHLOGRED

NLTLDIS

KLKEQIFEASKAHLNLVPGTEAIAAGVADGLANLNPVTWIKTIRSTMIINLILIVVCLF

CL

LLVCRCTQQLRRDSDIENGP

11. HERV-H19=HERV-H 2q24.3, имеющий аминокислотную последовательность
белка Env (SEQ ID No. 27):

MIFAGKAPSNTSTLMKFYSLLLYSLLSFPFLCHPLPLPSYLHHTINLTHSLLAASN
PSL

VNNCWLCISLSSSAYTAVPAVQTDWATSPISLHLRTSFNSPHLYPPEELIYFLDRSS

KTS

PDISHQQAALLRXYLKNLSPYINSTPPIFGPLTTQTTIPVAAPLCISWQRPTGIPLG

NL

SPSRCSFTLHLRSPTTNINETIGAFQLHITDKPSINTDKLKNISSNYCLGRHLPCISL

HP

WLSSPCSSDSPRPSSCLLIPSPENNSERLLVDTRRFLIHHENRTFPSTQLPHQSPLQ

PL

TAAALAGSLGVVWVQDTPFSTPSHLFTLHLQFCLAQGLFFLCGSSTYMCLPANWT

GTCTLV

FLTPKIQFANGTEELPVPLMTPTQKR VIPLIPLMVGLGLSASTVALGTGIAGISTSVMTFRSLSNDFASITDISQTLVLAQVDSLAAVVLQNRRLDLLTAEKGLCIFLNEECCFYLNQSGLVYDNIKKLDRAQKLANQASNYAEPWALS NWMSWVLPVSPLIPIFLLLLFGPCIFRLVSQFIONRIOAITNHSIQMFLLTSPQYHPLPQDLPSA

12. HERV-H 2q24.1, имеющий аминокислотную последовательность белка Env (SEQ ID No.28):

MILAGRAPSNTSTLMKFYSLLLYSLLFSFPFLYHPLPLPSYLHHTINLTHSLPAASN

PSL

ANNCWLCISLSSSAYIAVPTLQTD RATSPVSLHLRTSFNSPHLYPPEELIYFLDRSS

KTS

PDISHQPAALLHIYLKNLSPYINSTPPIFGPLTTQTTIPVAAPLCISRQRPTGIPLGN

I

SPSRCSFTLHLQSPTTHVTETIGVFQLHIIDKPSINTDKLKNVSSNYCLGRHLPYISL

HP

WLSPCSDSPRPSSCLLTPSPQNN SERLLVDTQRFLIHHENRTSSSMQLAHQSPL

QPL

TAAALAGSLGVVWVQDTPFSTPSHPFSLHLQFCLTQGLFFLCGSSTYMCLPANWT

GTCTLV

FLTPKIQFANGTKELPVPLMTLTPQKR VIPLIPLMVGLGLSASTIALSTGIAGISTSVTTFRSPSNDFASITDISQTLVLAQVDSLAAVVLQNRRLGLSILLNEECCFYLNQSGLVYENIKKLDRAQKLANQASNYAESPWALS NWMSWVLPILSPLIPIFLLLLLFGPCIFHLVSQFIONRIOAITNHSI

и имеющий аминокислотную последовательность белка Gag (SEQ ID No.29):

MGNLPPSIPSSPLACVLKLNKPLQLTPDLKPKCLIFFCNTAWPQYKLDNGSKWP
ENGTDFDSILQDLNFCRKMGWSEVPYVQAFFTLRSLPSLCSQC DASQILLLSLPPVPSV

PTPSVAESFRSSFSTDPDLSPPPQAARRQAELGPNSSSASAPPPYNLFIASPPHTWSGLQF
 HSMTSLPPPAQQFTLKKVAGAKGIVKVNAPFSLSQIR

13. HERV-W=ERVW-1=Синцитин-1, имеющий аминокислотную
 последовательность белка Env (SEQ ID No. 30):

MALPYHIFLFTVLLPSFTLTAPPPCRCMTSSSPYQEFLLWRMQRPGNIDAPSYRSL
 KGTP
 TFTANTHMPRNCYHSATLCMHANTHYWTGKMINPSCPGGLGVTVCWTYFTQT
 GMSDGGGV
 QDQAREKHVKEVISQLTRVHGTSSPYKGLDLSKLHETLRTHTRLVSLFNTTLTGL
 HEVSA
 QNPTNCWICLPLNFRPYVSIPVPEQWNNFSTEINTTSVLVGPLVSNLEITHTSNLTC
 VKF
 SNTTYTTNSQCIRWVTPPTQIVCLPSGIFFVCGTSAYRCLNGSSESMCFLSFLVPP
 MTIY
 TEQDLYSYVISKPRNKRVPILPFVIGAGVLGALGTGIGGITTSTQFYKLSQELNG
DMER
VADSLVTLODQLNSLAAVVLQNRALDLLTAERGGTCLFLGEECCYYVNQSGI
VTEKVKE
IRDRIORRAEELRNTGPWGLLSQWMPWILPFLGPLAAIILLLLFGPCIFNLLVNFVSS
RI
EAVKLQMEPKMQSKTKIYRRPLDRPASPRSDVNDIKGTPPEEISAAQPLLRPNSA
GSS

14. HERV-FRD=ERVFRD-1=Синцитин-2, имеющий аминокислотную
 последовательность белка Env (SEQ ID No. 31):

MGLLLLVLILTPSLAAYRHPDFPLEKAQQLLQSTGSPYSTNCWLCTSSSTETPGT
 АУРА
 SPREWTSIEAELHISYRWDPNLKGLMRPANSLLSTVKQDFPDIRQKPPIFGPIFTNI
 NLM
 GIAPICVMAKRKNGTNVGTLPSTVCNVTFTVDSNQQTYQTYTHNQFRHQPRFPK
 PPNITF
 PQGTLKSSRFCQGRPSSCSTRNFWFRPADYNQCLQISNLSSTA EWVLLDQTRN
 SLFWE
 NKTKGANQSQTPCVQVLGMIATSYLGISAVSEFFGTSLTPLFHFHISTCLKTQG
 AFYI
 CGQSIHQCLPSNWTGTCTIGYVTPDIFIAPGNLSLPIPIYGNSPLPRVRRAIHFIPLLA
G
LGILAGTGTGIAGITKASLTYSQLSKEIANNIDTMAKALTTMQEQIDSLAAVVLQ
NRRGL
DMLTAAOGGICLALDEKCCFWVNQSGKVQDNIRQLLNQASSLRERATOGWLN
WEGTWKWF

SWWLPLTGPLVSLLLLLLFGPCLLNLTQFVSSRLQAIKLQTNLSAGRHPRNIQESPF

15. HERV-E, имеющий аминокислотную последовательность белка Env (SEQ ID No. 32 и 33):

MQKLIMGFIFLKFWTYTVRASTDLTQTGDSCQCIHQVTEVGQQIKTMFLFYSYY
 KCIGTLKETCLYNATQYNVCSPGNDRPDVCYNPSEPPATTIFEIRIRTGLFLGDTSKIITRT
 EEKEIPKQITLRFDACAAINSKKGIGCDSLWERSYRIKNKYVCHESGVCENCAWPC
 VIWATWKKKNDKDPVYLQKGEANPSCAAGHCNPLELIITNPLDPHWKKGERTVTLGIDGT
 GLNPQVAILIRGEVHKCSPKPVFQTFYKELNLPAPFPKKTKNLFLQLAENVAHSLNVT
 CYVCGGTTIGDRWPWEARELVPTDPAPDIIPVQKTQASNFWVLKTSIIGQYCIAREGKDF
 IIPVVGKLNLCIGQKLYNSTTKTITWWGINHTEKNPFSKFSKLTAWAHPESHQDWMAPAG
 LYWICGHRAYIRLPNK*

MLNRIIRLQAILEIITNETGRALTVLARQETQTRNAIYQNRLALDYLLAAEGGVC
GKFNLTNCLQIDDQGOVVENIVRDMAKVAHVVPVQVWHKFNPELFGKWFPFAIGGFKT
LIVGVLLVIGTCLLLPCVLPLLFQMIKYFVVTLVHQKTSAHVYYTNHYRSISQRD

и имеющий аминокислотную последовательность белка Gag (SEQ ID No.34-38):

TPLGTMLKNFKKGFNGDYGVTMTPGKLRTLCEIDWPTLEVGPSEGLDGLSVS
 KVWHKVTSSKSGHSDQFPYIDTWLQLVLDPPQWLRGQAAAVLVAKGQIVKEGFCSTR*G
 KSTPEVLFDQTSQEDPLQEMAPVIPVLPSPYQGERLPTFESTVLAPLPDKCIPRPLRVDKRG
 GEASGETPPLAAHLRPKTGIQMPLREQQYTGIDEDGHMVESRVFVYQPFTSADLLNWK
 NNTPSYTEKPQALIDLLQTHIQTHTNPTWADCHQLLMFLFKTDER*RVLQAATKWLEEHA
 LADYQNPQEYVRTQLPGTDPQWDPN*REDMQRLNRYRKALLEGLKRRRAQKATNINKV
 SEVIQGKEESPAKFHERLCEAYCMYTPFDPDQSPENQRMINMALVSQSTEDIRKQLQKKA
 GFAGMNTSQLLEIANQVFNVRDAASRKETT*RMNVRPGETRLLAAAIRGVPPKEARQK
 GPGKETQPGCQSLQCNQCA YRKEIGYWKNKCPQLKKGKQGDSEQEAPDKEEGALLNL
 AEGLLD*

16. HERV-E, имеющий аминокислотную последовательность белка Env (SEQ ID No. 339):

MRKLIVGFIFLTFWTYTVRASTDLTQTGDSCQSIHQVTEVGQQIKTNFLFYSYYE
 CMGTLKETCLYNATQYKVCSPGNDRPDVCYNPSEPPATTVFEIRLRTGLFLGDTSKIITR
 TVEKGIPKQITLRFDARAANSNKLGTTRCGSLNWERSYTVQNKYVCHESGVCENCAFWP
 CUIWATWKKKNDKDPVHLQKGEANPSCAAGHCNPLELIITNPLDPPWKKGERVTLGIDG
 TGLNPQVAILVRGEVHKRSPKPVFQTFYEELNLPAPLPKKTSLFLQLAGNVAHSLNVT
 SCYVCRGTTIGDRWPWEARELVPTDPAPDIIPVQKAQASNFWVLKTSIIGQYCIAREGKE
 FIVPVGKLNLCIGQKLYNSTTKTITWWGLNHTEKNPFSKFSKLTAWAHPESHQDWTAPT
 GLYRICGHTAYIQLPNKWAGSCVIGTIKLSFFLLPIKTGELLGFRVYTSREKRGIVIGNWK
 DNEWPPERIIQYYGPATWVQDGSWGYQTPYMLNQIIRLQTVLEIITNETGRALTVLARQ
 ETQMRNAIYQNRLALDYLLAAEGGVCGKFNLTNCLQIDDQGOVVENIVRDMTKLAH
 TPIQVWHKFDPELFGKWFPFAIGGFKTLIVGVLLVIRTCLLLPCVLPLLFQMIKGIVATLVH
QKTSAHVNYMNHYSISQRDSKSEDESENSH

и имеющий аминокислотную последовательность белка Gag (SEQ ID No. 40):

MLKNFKKGFNGDYGVMTMPGKLRILCEIDWPTLEVGWPSEGLDRSLVSKVWH
 KVTGKSGHSDQFPYIDTWLLQLVQDPPQWLRGQAAAVLVAKGQIAKEGSRSTHWGKS
 TPEVLFDPTSEDPLQEMAPVIPVLPSPYQAERLPTFEPTVLVPPQDKHIPRPPRVDKRGGE
 ASGETPPLAACLRPKTGIQMPLREQRYTGIEEDGHMVEKRVFVYQPFTSANLLNWKNNT
 LSYTEKQPALIDLLQTIQTHNSTRADCHQLLMFLFNTDERQRVLQAATKWVQEHAPAD
 YQNPQECVRTQLPGTDPQWDPNEREDMQRLNRDREAVLEGLKRGAKATNVNKVSEV
 IRGKEESPAQFYQRLCEGYRMYTPFDPVSPENQRMVNMALVSQSAEDIRKQLQKQDGF
 AGTNTSQLLEVANQVFNRDVSPKENRRENERQARRNAELLA AAVGGVSSKRQKGG
 GPGKETQPGCQSLQCNQCA YCKEIGYWKNKCPQLKKGKQGDLEQVEVPDKEEGALLNLA
 EELLD.

Раковой мишенью для HERV-K является рак предстательной железы, рак молочной железы, рак яичника, лимфома, меланома, лейкоз и саркома. Раковой мишенью для HERV-H является рак прямой и ободочной кишки. Раковой мишенью для HERV-W является рак яичек, рак яичника, рак молочной железы, лимфома и лейкоз, а раковой мишенью для HERV-E является рак легких и рак печени.

Примеры

Материалы и методы, приведенные ниже, являются общими для последующих примеров.

Вакцины-прототипы (ДНК-MelARV и Ad5-MelARV) состоят из плазмидной ДНК (768tet) или аденовируса типа 5 (Ad5), который кодируется геном MelARVgag_p2A_env под контролем сильного предраннего промотора человеческого цитомегаловируса (промотора CMV). Этот ген одновременно экспрессирует белки Gag и Env MelARV, связанные посредством саморасщепляющегося пептида p2A. Хотя Gag индуцирует образование вирусоподобных частиц (VLP), однако, белок-мишень Env был интегрирован в образующиеся VLP.

Кроме того, были разработаны вакцины для нацеливания на белок оболочки (Env) человеческих эндогенных ретровирусов типа К (HERV-K или HML-2), экспрессирующихся в опухолевых клетках, и эти вакцины были протестированы на индуцирование клеточных и гуморальных иммунных ответов и противораковую эффективность.

Сконструированные вакцины содержат плазмидную ДНК (768tet), аденовирус типа 5 (Ad5) или аденовирус типа 19 (Ad19a), каждый из которых кодирует группоспецифический антиген (Gag) и гены Env (HERV-KGag_p2A_Env) под контролем сильного предраннего промотора человеческого цитомегаловируса (промотора CMV). Эти два белка экспрессируются одновременно с саморасщепляющимся пептидом p2A в качестве линкера, который остается связанным с белком Gag, участвующим в образовании вирусоподобных частиц (VLP). Белок Env включен в образовавшиеся VLP, и служит в качестве мишени для выработки специфических иммунных ответов.

Для улучшения качества вакцины в отношении индуцирования иммунных ответов была введена инактивирующая мутация ISD в кодируемый вакциной Env MelARV в целях

предотвращения иммуносупрессорных эффектов самой вакцины. Две точковых мутации индуцировали в последовательности трансмембранной субъединицы p15E Env. Глутаминовая кислота в положении 14 ISD была заменена аргинином, а аланин в положении 20 был изменен фенилаланином (фигура 3).

В вакцине HERV-K, иммунный ответ, индуцированный вакциной, был усилен путем введения точковой мутации в иммуносупрессорный домен (ISD) трансмембранной (TM) субъединицы белка Env HERV-K, а именно p15E. Эта модификация включала замену глутамина в положении 52 ISD на аланин (Schlecht-Louf et al., 2010) (см. фигуру 22). Такая модификация запускает инактивацию домена, что позволяет предотвратить продуцирование иммуносупрессорных эффектов самой вакцины.

Культивирование клеток

Различные клеточные линии были использованы в различных экспериментах. Все клеточные линии поддерживали при 37°C, 5% CO₂ в атмосфере повышенной влажности.

HEK293: HEK293 происходят от культуры почек человеческого эмбриона и были получены путем трансформации под действием фрагментированной ДНК аденовируса типа 5 (Ad5) [ATCC. 293 [HEK-293]. [Упомянуется 8 июня 2017 года]; Доступна на сайте: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1573.asp_x?geo_country=de].

Преимущества этой клеточной линии заключаются в легкости ее культивирования и эффективности трансфекции. Еще одним преимуществом является экспрессия гена Ad5 E1 [Kovesdi, I. and S.J. Hedley, Adenoviral producer cells. *Viruses*, 2010. **2**(8): p. 1681-703]. Рекомбинантные вакцины Ad5 обычно вводят в форме, дефицитной по репликации, и это означает, что они имеют делеции в генах, необходимых для репликации вируса, таких как E1. В этом случае, недостающие гены должны поставляться извне в процессе продуцирования вируса. Клетки HEK293 обеспечивают необходимые для репликации белки и, следовательно, могут быть использованы в качестве клеток-продуцентов в процессе продуцирования вируса [Kovesdi, I. and S.J. Hedley, Adenoviral producer cells. *Viruses*, 2010. **2**(8): p. 1681-703]. В современных экспериментах, клетки HEK293 поддерживали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с добавлением 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (FBS), L-глутамина (2 мМ), Na-пирувата (1 мМ) и пенициллина+стрептавидина (Pen/Strep).

T-REx Ав-токсические клетки HEK293 (Ав-токсические клетки): Ав-токсические клетки представляют собой модифицированные клетки HEK293, которые используются для предотвращения экспрессии Ad5-кодируемых рекомбинантных белков в процессе продуцирования вируса. При этом требуется ингибирование экспрессии этих рекомбинантных белков, поскольку некоторые кодируемые белки-мишени являются токсичными для клеток HEK293 и препятствуют продуцированию вируса [Cottingham, M.G., et al., Preventing spontaneous genetic rearrangements in the transgene cassettes of adenovirus vectors. *Biotechnol Bioeng*, 2012. **109**(3): p. 719-28]. Клетки HEK293 были модифицированы в две стадии для включения различных механизмов супрессии белков. Первый механизм включает супрессию системой T-REX [Fisher, T. Inducible Protein

Expression - T-REx™ System. 2011 [упоминается 8 июня 2017 года]; доступна на сайте: <https://www.thermofisher.com/dk/en/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/protein-expression-protocol/inducible-protein-expression-using-the-trex-system.html>]. Клетки T-REx-293 были генетически модифицированы для экспрессии белка-репрессора тетрациклина (репрессора Tet), который связывается с оператором Tet и подавляет его. Это приводит к экспрессии рекомбинантных белков-мишеней под контролем сильного промотора CMV.

Поскольку система T-REx не является полностью эффективной в предотвращении экспрессии белка-мишени, то клеточная линия T-REx-293 была дополнительно модифицирована Sirion Biotech GmbH (Martinsried, Germany). Новая клеточная линия HEK293_T-REx_Avtoxic (Av-токсические клетки) экспрессирует короткую шпилечную РНК (кшРНК), нацеленную на последовательность матричной РНК (мРНК), обозначаемой p2TS, которая транскрибируется вместе с белком-мишенью. кшРНК вызывает деградацию мРНК, содержащей p2TS и, тем самым, подавляет рекомбинантный белок. Av-токсические клетки поддерживали в среде DMEM с добавлением 10% термоинактивированной FBS, L-глутамина (2 мМ), Na-пирувата (1 мМ) и Pen/Strep.

HEK293(CCS)-shmir-pIX 221-puro (pIX-клетки): pIX-клетки представляют собой модифицированные клетки HEK293, используемые для продуцирования вирусов Ad5-pIX, которые презентуют антиген на вирусном капсидном белке pIX. Природный белок pIX кодируется аденовирусным геном E1, экспрессирующимся в клетках HEK293. Для предотвращения интеграции нативной pIX в вирусную частицу в целях облегчения включения рекомбинантного pIX, клетки HEK293, кодирующие pIX, были ингибированы под действием экспрессии кшРНК в pIX-клетках. Транскрипция кшРНК в процессе продуцирования вируса была индуцирована доксициклином. Кроме того, клетки трансдуцировали геном рас, кодирующим пурамицин-N-ацетил-трансферазу (РАС), что позволяет проводить отбор кшРНК-экспрессирующих клеток с использованием пурамицина. Таким образом, клетки поддерживали в среде DMEM с добавлением 10% термоинактивированной FBS, L-глутамина (2 мМ), Na-пирувата (1 мМ), Pen/Strep и 0,5 мкг/мл пурамицина.

B16F10-GP: Клеточная линия B16 представляет собой клеточную линию мышинной меланомы, которая происходит от мышей C57BL/6J [ATCC. B16-F10. [упоминается 8 июня 2017 года]; доступна на сайте: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-6475.aspx?geo_country=de]. B16F10 представляет собой вариант, который является более пролиферативным и часто используется для анализа метастазов у мышей C57BL/6. Этот вариант был получен путем проведения 10 последовательных раундов отбора на метастазы в легких после внутривенных инъекций клеток B16 мышам [[Fidler, I.J., Selection of successive tumour lines for metastasis. Nat New Biol, 1973. 242(118): p. 148-9., Fidler, I.J. and G.L. Nicolson, Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines. J. Natl Cancer Inst, 1976. 57(5): p. 1199-202.]. Клеточная линия, используемая в экспериментах, B16F10-GP, экспрессирует дополнительный

иммунодоминантный эпитоп гликопротеина (GP33-41), вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) [Prévost-Blondel, A., et al., Tumor-Infiltrating Lymphocytes Exhibiting High Ex Vivo Cytolytic Activity Fail to Prevent Murine Melanoma Tumor Growth In Vivo. *The Journal of Immunology*, 1998. **161**(5): p. 2187-2194.]. Клетки поддерживали в среде DMEM с добавлением 10% термоинактивированной FBS, L-глутамина (2 мМ), Na-пирувата (1 мМ) и Pen/Strep.

CT26: CT26 представляет собой клеточную линию мышинной карциномы толстой кишки, происходящую от мыши BALB/C и полученную от д-ра Anders Elm Pedersen. Эта клеточная линия была использована для тестирования роста первичной опухоли у мышей [ATCC. CT26.WT. [[упоминается 8 июня 2017 года]; доступна на сайте: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2638.aspx?geo_country=de#generalinformation]. Клетки поддерживали в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI) с добавлением 10% термоинактивированной FBS, L-глутамина (2 мМ), Na-пирувата (1 мМ) и Pen/Strep.

4T1-Luc: 4T1 представляет собой клеточную линию мышинного рака молочной железы, происходящую от мыши Balb/C. При введении в жировую прокладку молочной железы мыши, клетки образуют первичные опухоли, которые метастазируют в легкие, в печень, в лимфоузлы и в головной мозг [ATCC. 4T1. [упоминается 4 августа 2017 года]; доступна на сайте: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2539.aspx?geo_country=de#characteristics]. Клеточная линия была стабильно трансфицирована люциферазным белком-репортером (Luc). Клетки поддерживали в среде RPMI с добавлением 10% термоинактивированной FBS, L-глутамина (2 мМ), Na-пирувата (1 мМ) и Pen/Strep.

Клетки Vero: Клетки Vero представляют собой клеточную линию почек приматов, происходящую от африканской зеленой марьяшки (*Cercopithecus aethiops*) [ATCC. Vero. [упоминается 8 июня 2017 года]; доступна на сайте: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-81.aspx?geo_country=de#characteristics]. Эта клеточная линия является в высокой степени трансдуцируемой посредством инфицирования человеческим Ad5 без поддержания продуцирования новых вирионов, а поэтому, она была использована для анализа экспрессии белка и высвобождения VLP Ad5-вакциной. Клетки поддерживали в среде DMEM с добавлением 10% термоинактивированной FBS, L-глутамина (2 мМ), Na-пирувата (1 мМ) и Pen/Strep.

Клетки A549 представляют собой человеческие эпителиальные клетки легких, подходящие для осуществления трансфекции вирусом. Таким образом, клетки A549 были использованы для трансфекции аденовирусом, содержащим представляющую интерес последовательность для продуцирования VLP. Секрецию VLP анализировали методом Вестерн-блот-анализа (WB), и их присутствие на клеточной поверхности детектировали методом клеточного сортирования с активацией флуоресценции (FACS) и визуализировали под электронным микроскопом (ЭМ). Эти клетки поддерживали в среде Хэмса F-12, модифицированной Кейном (в среде Хэмса F-12K), с добавлением 10%

термоинактивированной FBS, Pen/Strep и пирувата натрия (1 мМ).

Клетки Rensa, экспрессирующие белки Gag и Env. Клетки Rensa представляют собой эпителиальные клетки почек мышей (*Mus Musculus*). Эти клетки были получены из почечной аденокарциномы мышей balb/c. Рост и прогрессирование опухоли точно соответствуют росту и прогрессированию опухоли, наблюдаемым при клеточной карциноме почек человека, а в частности, имитируют спонтанное метастазирование в печень и в легкие. Клетки, используемые в нижеследующих примерах, были любезно предоставлены профессором Dr. Barbara Schnierle (Langen, Germany). В некоторых из нижеследующих примеров, клетки были модифицированы так, чтобы они экспрессировали белки Env или Gag человеческого эндогенного ретровируса типа К (HERV-К). Это позволяет индуцировать опухоли, которые экспрессируют белки HERV-К у мышей и создать соответствующую мышиную модель для тестирования новой стратегии вакцинации согласно изобретению, направленной против экспрессии белков ERV в человеческих раковых опухолях. Эти клетки поддерживали в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) с добавлением 10% термоинактивированной FBS, 20×10^6 ИЕ/л пенициллина и 5 г/л стрептомицина, 2,9 г/л L-глутамин (2 мМ) и 3,7 г/л пирувата натрия (1 мМ) при pH 7,2.

Первичные культуры куриных эмбриональных фибробластов (CEF) широко используются для культивирования вируса. 11-дневные куриные яйца от Jens Toft, Lohmann (Дания) были использованы для приготовления культур CEF в соответствии с протоколом (Staib et al., 2004). В этом случае, клетки CEF использовали для продуцирования модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), кодирующего чужеродные антигены Env и Gag HERV-К. Причина работы с этими клетками конкретного типа заключается в том, что репликация MVA ограничена клетками птиц, а это означает, что MVA не репродуцируется в большинстве клеток млекопитающих и делает их не подходящими для данной цели (Altenburg et al., 2014). Клетки CEF культивировали в среде CEF, состоящей из среды RPMI с добавлением 3,7 г/л пирувата натрия, 10% термоинактивированной FBS и 1% (об/об) антибиотиков-противогрибковых средств (GibcoTM, 15240062).

Фибробласты почек детенышей хомячка (клетки ВНК-21) были первоначально получены из клеток почек детенышей сирийского золотистого хомячка (*Mesocricetus Auratus*). Специфическая клеточная линия, используемая в последующих примерах, была любезно представлена проф. Allan Randrup Thomsen (Копенгагенского Университета, Дания). Клетки ВНК-12 использовали для титрования Env и Gag MVA, поскольку, как известно, они представляют собой одну из немногих клеточных линий, которые позволяют осуществлять репликацию MVA. Эти клетки поддерживали в среде CEF, состоящей из среды RPMI с добавлением 3,7 г/л пирувата натрия, 10% термоинактивированной FBS и 1% (об/об) антибиотиков-противогрибковых средств (GibcoTM, 15240062).

Плазмидные конструкции

Для получения рекомбинантных аденовирусов, белок-мишень клонировали в модифицированный аденовирусный вектор Capture-pBGH. Этот вектор содержит геном Ad5 с делециями в генах E1 и E3. Кроме того, он содержит области, гомологичные вектору 768tet, что способствует включению промотора CMV и 3'-хвоста полиаденилирования (polyA), и экспрессирует рекомбинантные белки под контролем оператора Tet (фиг. 4) [Becker, T.C., et al., Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. *Methods Cell Biol*, 1994. 43 Pt A: p. 161-89]. Таким образом, белки-мишени сначала встраивали в 768tet посредством субклонирования, ПЦР-клонирования или сборки Гибсона, а затем клонировали в Capture-pBGH (фиг. 4) посредством гомологичной рекомбинации (фиг. 5).

Для рIX-модификаций аденовируса, белки-мишени клонировали в общий экспрессионный вектор pcDNA3, который также кодирует рIX и линкерную последовательность (содержащую FLAG-метку), а затем вводили рестрикционные сайты для встраивания представляющего интерес гена (pcDNA3_pIX_Taglinker_xxx, где xxx=антиген-мишень). Экспрессионный вектор трансфецировали в клетки-продуценты для индуцирования экспрессии рекомбинантного рIX в этих клетках.

Различные используемые плазмидные конструкции перечислены в Таблице 1.

Таблица 1: Список плазмидных конструкций, используемых для клонирования, продуцирования вируса и вакцинации. Также перечислены ДНК-плазмиды, используемые в этих целях, включая сокращения, используемые в настоящем описании. Кроме того, кодируемые вектором гены указаны в столбце «Описание», а применение плазмидных ДНК описано в столбце «Цель».

Плаزمида	Сокращение	Описание	Цель
768tet_MelARVgag_p2A_envSTOP	ДНК-MelARV	Экспрессионный вектор с MelARVgag и MelARVenv под контролем промотора CMV и оператора Tet	- Вакцинация - клонирование в Capture-pBGH
pBGH_MelARVgag_p2A_envSTOP		Геном Ad5 с MelARVgag и MelARVenv под контролем промотора CMV	- Продуцирование Ad5
768tet_MelARVgag_p2A_envISDmutSTOP	ДНК-MelARV-ISD	Экспрессионный вектор с MelARVgag и с ISD-мутированным MelARVenv под контролем промотора CMV и оператора Tet	- Вакцинация - клонирование в Capture-pBGH

pBGH_MelARVgag_p2A_envSTOP		Геном Ad5 с MelARVgag и с ISD-мутированным MelARVenv под контролем промотора CMV	- Продуцирование Ad5
pcDNA3_pIX-Taglinker-p15E	ДНК-pIX-p15E	Экспрессионный вектор с p15E, связанным с pIX под контролем промотора CMV	-Модификация Ad5-pIX
pcDNA3_pIX-Taglinker-p15E-ISDmut	ДНК-pIX-p15E-ISD	Экспрессионный вектор с ISD-мутированным p15E, связанным с pIX под контролем промотора CMV	-Модификация Ad5-pIX
pcDNA3_pIX-Taglinker-p15E-trunc-wC	ДНК-pIX-p15E-trunc-wC	Экспрессионный вектор с усеченным p15E, содержащим дополнительный цистеин, связанный с pIX, под контролем промотора CMV	-Модификация Ad5-pIX
pcDNA3_pIX-Taglinker-p15E-trunc-w/oC	ДНК-pIX-p15E-trunc-w/oC	Экспрессионный вектор с усеченным p15E, без дополнительного цистеина, связанного с pIX, под контролем промотора CMV	-Модификация Ad5-pIX
pcDNA3_pIX-Taglinker-GFP	ДНК-pIX-GFP	Экспрессионный вектор с GFP, связанным с pIX под контролем промотора CMV	-Контрольная плазида
768tet_SIVgag_p2A_LucSP_MelARV_HA-TMCT	ДНК-LucSP_MelARV_HA-TMCT	Экспрессионный вектор с gag SIV и MelARVenv, содержащими люциферазный	-Клонирование в Capture-pBGH

		сигнальный пептид и трансмембранный домен гемаглютинина вируса гриппа+цитоплазматический хвост	
pBGH_SIVgag_p2A_LucSP_MelARV_HA-TMCT		Геном Ad5 с gag SIV и MelARVenv, содержащими люциферазный сигнальный пептид и трансмембранный домен гемаглютинина вируса гриппа+цитоплазматический хвост	-Продуцирование Ad5
768tet_SIVgag_p2A_LucSP_GCN4_p15E_HA-TMCT	ДНК-LucSP_GCN4_p15E_HA-TMCT	Экспрессионный вектор с gag SIV и p15E MelARV, содержащими люциферазный сигнальный пептид, последовательность тримеризации и трансмембранный домен гемаглютинина вируса гриппа+цитоплазматический хвост	-Клонирование в Capture-pBGH
pBGH_SIVgag_p2A_LucSP_GCN4_p15E_HA-TMCT		Геном Ad5 с gag SIV и p15E MelARV, содержащими люциферазный сигнальный пептид, последовательность тримеризации и трансмембранный домен гемаглютинина вируса гриппа+цитоплазматический хвост	-Продуцирование Ad5

		ий хвост	
pCI-neoGFP	ДНК-GFP	Экспрессионный вектор с GFP	-Контрольная плазида
p06A19a(II)-(TetO)-CMV-coHERV-K-P2TS		Вектор, содержащий вставку VLP HERV-K дикого типа под tet-регулируемым контролем промотора CMV, за которой следует сигнал нацеливания на микроРНК, экспрессирующийся в клетках ProVector, и сайты polyA SV40. Экспрессионный кластер содержит 5'-область hAd19a/64 и у С-конца, сигналы рекомбинации для рекомбинации в плазмиды ВАС, содержащие остальную часть генома hAd19a с делетированным E1.	Рекомбинация в E. coli как описано в EP2870236
p06A19a(II)-(TetO)-CMV-ISDmut_coHERV-K-P2TS		Вектор, содержащий вставку VLP HERV-K с ISD-мутацией под tet-регулируемым контролем промотора CMV, за которой следует сигнал нацеливания на микроРНК, экспрессирующийся в клетках ProVector, и сайты polyA SV40. Экспрессионный кластер	Рекомбинация в E. coli как описано в EP2870236

		содержит 5'-область hAd19a/64 и у С-конца, сигналы рекомбинации для рекомбинации в плазмиды ВАС, содержащие остальную часть генома hAd19a с делетированным E1.	
--	--	--	--

Клонирование

В целях получения новых конструкций ДНК для продуцирования и тестирования аденовирусных вакцин были применены различные стратегии клонирования.

Субклонирование

Для субклонирования, последовательность ДНК-мишени переносили из одной плазмиды (донорного вектора) в другую плазмиду (вектор-мишень). Донорный вектор и вектор-мишень разрезали посредством рестрикционного расщепления в сайте лигирования. Для предотвращения повторного лигирования, вектор-мишень обрабатывали щелочной фосфатазой кишечника телят (CIP), которая катализирует дефосфорилирование у 5'- и 3'- концов ДНК. Расщепленную ДНК разделяли на 1% агарозном геле, содержащем краситель GelGreen (#41004, Biotium). Нужные ДНК-полосы вырезали, и компоненты ДНК экстрагировали с использованием набора для гель-экстракции E.Z.N.A (D2500; OMEGA bio-tek). Вкратце, гель растворяли в одном колоночном объеме буфера для связывания (XP2) и загружали на миниколонки с ДНК HiBind®. После двойной промывки, колонку сушили и ДНК два раза элюировали в буфере для элюирования.

После очистки, вектор и вставки смешивали в стехиометрическом отношении 1:3. Лигирование двух фрагментов ДНК катализировали с использованием смеси для присоединения «липких» концов к лигазе Instant Master Mix (M0370; New England Biolabs). Лигированный продукт переносили в компетентные клетки XL1-Blue (# 200249, Agilent Technologies). Для трансформации, к бактериальной суспензии добавляли ДНК и инкубировали в течение 10 минут на льду. Затем клетки делали проницаемыми с помощью теплового шока при 42°C в течение 45 сек. После инкубирования в течение 2 минут на льду добавляли супероптимальную бульонную среду (среду SOC), и бактерии инкубировали со встряхиванием в течение 1 часа при 37°C.

Бактериальную суспензию наносили штрихами на агаровый планшет с лизогенной бульонной средой (средой LB), содержащей соответствующий антибиотик, и инкубировали в течение ночи при 37°C.

Для скрининга на «правильные» конструкции, некоторые бактериальные колонии амплифицировали для приготовления мини-плазмиды (см. ниже «0 ДНК-препарат»). Выделенную плазмидную ДНК разрезали путем гидролиза рестриктирующими

ферментами и анализировали с помощью гель-электрофореза.

Для конструкций HERV-K (и соответствующего контроля), субклонирование осуществляли для встраивания конструкций ДНК, содержащих представляющую интерес последовательность (DNA_ISDmut_coHERV-K-P2TS и DNA_coHERV-K-P2TS), в акцепторную плазмиду 768(TetO)-SP-ALB-CIDR. Для этой цели, вставки и акцептор сначала амплифицировали с использованием клеток PIR1 и XL1-Blue и маркеров отбора Kan и Amp, соответственно. Все конструкции были гидролизованы с использованием XbaI (New England Biolabs, R0145) и SmaI (New England Biolabs, R0604) вместе с NEBuffer™ 3.1 (New England Biolabs, B7203) в течение 1 часа и 30 минут при 37°C, так как активность фермента XbaI при использовании NEBuffer 3.1 составляла только 75%. ДНК разделяли с помощью электрофореза с использованием 1% агарозного геля и красителя GelGreen (100 В, 200 А, 1 ч.). Полосы, содержащая вставку, а также полосы, содержащие 768(TetO), разрезали и очищали с использованием набора для гель-экстракции E.Z.N.A® (OMEGA bio-tek, D2500) в соответствии с инструкциями производителя, и элюировали в 20 мкл сверхчистой воды (UPW).

Для лигирования конструкций, 40 нг акцепторного вектора и 120 нг каждой вставки инкубировали в течение 15-30 минут при разведении 1:2 смеси для присоединения «липких» концов к лигазе Instant Master Mix (2X) при 37°C. Трансформацию проводили с использованием клеток XL1-Blue и получали ДНК с использованием минипрепарата (как описано ниже). Затем проводили тестируемое разрезание, для того, чтобы подтвердить, была ли представляющая интерес последовательность правильно встроена в акцепторный вектор. Если это подтверждалось, то проводили новую трансформацию и получали мидипрепарат (как описано ниже) для повышения концентрации ДНК.

ПЦР-клонирование

В отличие от субклонирования, ПЦР-клонирование характеризуется образованием вставок посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР). Последовательность-мишень амплифицируют с помощью ПЦР из вектора-донора с использованием специфических праймеров удлинения для встраивания ферментативных рестрикционных сайтов. Праймеры заказывали у TAG, Copenhagen, и смешивали с матрицей и ПЦР-смесью «горячего старта» PfuUltra II Hotstarter PCR Master Mix (# 600850, Agilent Genomics). ПЦР инициировали путем 2-минутного инкубирования при 95°C для активации полимеразы Taq и облегчения полной денатурации матричной ДНК. После первой стадии проводили 30 циклов денатурации при 95°C, отжига при 60°C и удлинения ДНК при 72°C. ПЦР была завершена путем проведения конечной стадии в течение 3 минут при 72°C для завершения удлинения ДНК.

ДНК выделяли из реакционной смеси с использованием набора для гель-экстракции E.Z.N.A (D2500; OMEGA bio-tek) в соответствии с протоколом «Очистки из ферментативной реакционной смеси». Для удаления остаточной геномной ДНК, очищенный ПЦР-продукт обрабатывали DpnI (R0176, New England Biolabs), который

представляет собой фермент, разрезающий метилированную ДНК. ДНК подвергали ферментативному гидролизу в специфических рестрикционных сайтах и очищали с использованием набора для гель-экстракции E.Z.N.A. Гидролиз вектора-мишени и лигирование осуществляли в соответствии с описанным ранее протоколом субклонирования.

Что касается конструкций HERV-K (и соответствующего контроля), то для продолжения реакции посредством гомологичной рекомбинации, NotI-сайт, содержащийся внутри последовательностей HERV-K WT/ISDmut, должен быть удален так, чтобы NotI мог быть затем использован для правильной линейаризации плазмид и, тем самым, для соответствующей рекомбинации. Для этого, обе последовательности (768(TetO)-SP-alb-CHT-HERV-K WT/ISDmut), полученные после проведения вышеописанной процедуры субклонирования, разрезали XbaI (New England Biolabs, R0145) и BspEI (New England Biolabs, R0540) вместе с NEBuffer™ 3.1 (New England Biolabs, B7203) в течение 1,5 часа при 37°C, и разделяли с помощью электрофореза на 1% агарозном геле, содержащем краситель GelGreen. Полосы ДНК, содержащие NotI-сайт, необходимый для удаления, гидролизовали и элюировали с использованием набора для гель-экстракции E.Z.N.A.[®].

Прямой праймер, используемый для ПЦР-реакции, отжигали у 3'-конца последовательности Env HERV-K, а в частности, в рестрикционном сайте BspEI (5'-CCCGTGTCCGGACCTGAG-3'; SEQ ID No.45), а обратный праймер отжигали у 5'-конца последовательности Env HERV-K, а в частности, в рестрикционном сайте XbaI (5'-GTTCTAGACTTGTCCCTGAATTTTCTGGTTA-3'(SEQ ID NO: № 46). Обратный праймер содержал модификацию в NotI-сайте для его элиминации. Праймеры были получены у TAG Copenhagen A/S (Копенгаген, Дания).

10 нг матричной ДНК (1 нг/мкл), 10 мкМ каждого праймера и 1:2-разведение ПЦР-смеси «горячего старта» PfuUltra II Master Mix (Agilent Technologies, 600850) использовали для приготовления реакционной смеси для каждой конструкции ДНК. ПЦР-реакция включала первую стадию денатурации (95°C, 5 минут), а затем 35 циклов, которые включали стадию денатурации (95°C, 30 сек.), стадию отжига (58°C, 25 сек.) и конечную стадию удлинения (72°C, 45 сек.). И, наконец, проводили последнюю стадию удлинения (72°C, 10 минут) и образец хранили при 4°C.

Продукты ПЦР, вместе с акцепторной плазмидой, разделяли с помощью гель-электрофореза и нужные полосы собирали и обрабатывали как описано выше в разделе «Субклонирование», в результате чего были получены конструкции 768(TetO)-HERV-K-Gag-P2A-ENV дикого типа и ISDmut, которые в своей последовательности уже не содержали сайта рестриктирующего фермента NotI.

Сборка Гибсона

Сборку Гибсона осуществляли для объединения нескольких фрагментов ДНК в одну конструкцию. Фрагменты амплифицировали с помощью ПЦР с удлинением для добавления выступающих концов, гомологичных вектору-мишени. ПЦР-продукты

обрабатывали и очищали, как описано в разделе «ПЦР-клонирование». Вектор-мишень линейаризовали посредством гидролиза рестриктирующими ферментами в сайте инсерции. Для сборки фрагментов, линейаризованный вектор-мишень и очищенные вставки смешивали в стехиометрическом отношении 1:3 и инкубировали в течение 1 часа при 50°C со смесью Master Mix для сборки Гибсона (E2611; New England Biolabs). Такую сборку облегчали три ключевых фермента в Master Mix. Экзонуклеаза удаляла ДНК у 5'-конца фрагментов и создавала одноцепочечные выступающие 3'-концы, которые гибридизуются в гомологичных областях с другими фрагментами. Нуклеотиды встраивали в оставшиеся гэпы с помощью ДНК-полимеразы. И наконец, ДНК-лигаза присоединяла одноцепочечные разрывы в собранной ДНК. Как и в ранее описанных методах клонирования, собранную ДНК переносили в бактерии с последующим скринингом на «правильные» конструкции.

Гомологичная рекомбинация для получения рекомбинантных аденовирусных геномов

Встраивание гена-мишени в геном аденовируса (Ad5) осуществляли с помощью гомологичной рекомбинации в *E. coli*. Вставку (ген-мишень) от 768tet с областями, гомологичными вектору-мишени, вырезали посредством гидролиза рестриктирующими ферментами и очищали с помощью гель-электрофореза. Акцепторный вектор, Capture-rBGH (геном Ad5) аналогичным образом линейаризовали путем гидролиза рестриктирующими ферментами. Для предотвращения повторного лигирования, разрезанный вектор был подвергнут обработке СІР (см., Субклонирование). Затем, вектор-ДНК очищали путем преципитации этанолом. Вкратце, ДНК осаждали в 0,3М ацетата натрия и 70% этанола, замораживали в течение 20 минут при -80°C и центрифугировали при 16000× g в течение 15 минут (4°C). Осадок промывали в 70% этаноле и центрифугировали в течение еще 5 минут. После сушки при комнатной температуре (КТ), ДНК ресуспендировали в воде. Для предотвращения повторного лигирования присоединяли аденозиновые выступающие концы с использованием ДНК-полимеразы «горячего старта» Tempase (# 230306; Ampliqon). После этого, ДНК очищали путем экстракции фенолом-хлороформом. Для этой цели, к реакционной смеси добавляли фенол-хлороформ с последующим центрифугированием при 16000× g в течение 10 минут. Верхнюю водную фазу переносили в новую реакционную пробирку, и ДНК экстрагировали путем осаждения этанолом как описано выше.

Для объединения вектора и вставки с помощью гомологичной рекомбинации, оба компонента смешивали в стехиометрическом отношении 1:3 и добавляли к компетентным по электропорации клеткам BJ5183. Бактерии переносили в кювету для электропорации (# 1652086; Bio-Rad) и делали проницаемыми путем электропорации в устройстве для импульсной обработки генов (Bio-Rad) при 25 мкФ, 2,5 кВ и 200 Ом. После электропорации, клетки переносили в среду SOC, а затем обрабатывали как описано выше в соответствии с протоколом теплового шока (см. «Субклонирование»).

Нижеследующие плазмиды были предоставлены Sirion Biotech: cDNA_HERV-

K(Gag_p2A_Env)

cDNA_HERV-K(Gag_p2A_Env-(Q6A)ISD-mut).

Те же самые конструкции, но кодируемые вектором Ad19a, были также предоставлены Sirion.

Конструкции кДНК амплифицировали и использовали в качестве ДНК-вакцин, а также в качестве инсерционных векторов в стратегиях клонирования, конечной целью которых является получение векторов Ad5, кодирующих вышеупомянутые последовательности, которые могут быть использованы в качестве вакцин. В частности, для получения конструкций HERV-K, кодируемых в hAd5 (и соответствующий контроль), представляющий интерес ген клонировали в плазмиду pBGH, кодирующую человеческий геном Ad5 с делециями в генах E1 и E3. Трансген встраивали вместо E1 путем гомологичной рекомбинации с плазмидой 768tet, кодирующей представляющий интерес ген. Эта стратегия была выбрана потому, что обычное клонирование посредством гидролиза рестриктирующими ферментами и лигирование являются крайне неэффективными при использовании вектора pBGH, представляющего собой очень большую плазмиду с более чем 38 т.п.о.

Гомологичную рекомбинацию между 768tet и плазмидой для захвата pBGH проводили в *E.coli*. Вектор для захвата содержал белок, флуоресцирующий в зеленом диапазоне спектра (GFP) в качестве вставки, которая должна быть заменена представляющим интерес геном.

Так как плазида pBGH, кодирующая человеческий геном Ad5, является слишком крупной (<38 т.п.о.) для проведения общей стратегии клонирования, в которой осуществляется расщепление рестриктирующим ферментом для встраивания нужной конструкции, то для ее встраивания вместо E1 была проведена гомологичная рекомбинация.

Сначала, акцепторный вектор pBGH линейаризовали с использованием фермента SwaI (New England Biolabs, R0604) при 37°C в течение 2 часов. При этом, 768(TetO)-HERV-K-Gag-p2A-ENV дикого типа и ISDmut гидролизовали ферментом NotI (New England Biolabs, R3189) в течение 1 часа. Продукт реакции разделяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, содержащем GelGreen. Последовательность HERV-K, фланкированную гомологичными областями, необходимыми для рекомбинации, собирали из геля, и ДНК выделяли с использованием набора для гель-экстракции E.Z.N.A[®] (Omega bio-tek, D2500) в соответствии с инструкциями изготовителя и элюировали в UPW.

После расщепления pBGH, 3'- и 5'-концы фосфорилировали с использованием щелочной фосфатазы кишечника телят (30 минут, 37°C; M0290) для предотвращения повторного лигирования. Затем вектор подвергали преципитации этанолом в 0,3 М ацетата натрия и 70% (об/об) этанола в течение 20 минут при -80°C. Сразу после этого, образец центрифугировали (15 минут, 4°C, 16000× g) и осадок промывали 70%-ным (об/об) этанолом. Вектор подвергали другому центрифугированию (5 минут, 4°C, 16000× g), и полученный осадок оставляли для сушки при комнатной температуре, и, наконец,

ресуспендировали в UPW.

Для дальнейшего предотвращения повторного лигирования вектора pBGH, его обрабатывали ДНК-полимеразой «горячего старта» Tempase (Ampliqon, 230306) в течение 30 мин при 72°C, что приводило к добавлению аденозиновых выступающих концов. ДНК очищали путем добавления фенола/хлороформа, центрифугировали (10 минут, 4°C, 16000× g), а затем верхнюю водную фазу, содержащую ДНК, переносили в микроцентрифужную пробирку. ДНК подвергали преципитации этанолом как описано ранее для дополнительной очистки и разводили в UPW.

Все плазмиды хранили в воде, но не в буфере для элюирования, поскольку соли негативно влияют на эффективность электропорации. Вектор pBGH и вставки HERV-K WT/ISDmut были объединены в молярном отношении 1:3 вместе с компетентными по электропорации клетками BJ5183 (Agilent, 200154). Затем смесь переносили в кювету для электропорации (Bio-Rad, 1652086), которая была использована для сообщения клеткам проницаемости в устройстве для импульсной обработки генов (Bio-Rad) при 25 мкФ, 2,5 кВ и 200 Ом. После этого добавляли среду SOC для восстановления компетентных клеток *E. coli* после трансформации. Затем их инкубировали в инкубаторе со встряхиванием в течение 1 часа при 37°C. И наконец, смесь высевали на планшеты с агаром LB, содержащим Kan, и инкубировали при 37°C в течение ночи.

Для того, чтобы убедиться в правильности гомологичной рекомбинации, ДНК выделяли с использованием минипрепаратов, как описано ниже. Затем ее гидролизовали рестриктирующими ферментами и разделяли в 1% агарозном геле, содержащем краситель GelGreen. Полосы, соответствующие нужному размеру pBGH, и вставки вырезали и переносили в *E. coli*, и, наконец, ДНК снова выделяли с использованием миди-препарата, как описано ниже.

ДНК-препарат

Трансформация *Escherichia coli* (*E.coli*)

Для трансформации использовали химически компетентные *E. coli*, суперкомпетентные клетки XL1-Blue (Agilent, 200236), а также химически компетентные клетки PIR1 One Shot™ (ThermoFisher Scientific, C101010). 20 мкл последних вместе с 10 нг плазмидной ДНК смешивали вместе и выдерживали на льду в течение 3 минут. После этого, смесь подвергали тепловому шоку в водяной бане TW80 (Julabo) в течение 45 секунд при 42°C, и снова помещали на лед на 3 минуты. Сразу же после этого, 200 мкл супероптимального бульона со средой для репрессии катаболитов (SOC) (20 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 0,58 г NaCl, 0,19 г KCl, 3,96 г глюкозы и 5,04 г MgSO₄•7H₂O) добавляли к образцам, а затем помещали в шейкерные инкубаторы на 1 час при 37°C. Конечная стадия включала помещение образцов на планшеты с агаром LB, содержащим соответствующий антибиотик (ампициллин (Amp): 100 мкг/мл, канамицин (Kan): 50 мкг/мл), к которому полученная авторами плаزمида является резистентной, и помещение в инкубатор на агаровые планшеты с *E.coli* (со связующим веществом) при температуре 37°C на ночь.

Электрофорез в агарозном геле

Для подтверждения правильности трансформации, очищенные конструкции ДНК подвергали электрофорезу на 1% (маас/об) агарозном геле, содержащем этидийбромид или краситель GelGreen™ (Biotium, 41004) для визуализации ДНК под ультрафиолетом (УФ). К образцам добавляли 1× буфер для загрузки (6×) и загружали на гель вместе с маркером GeneRuler размером 1 т.п.о. плюс ДНК-лэддер (Thermo Fisher Scientific, SM1331). В качестве буфера использовали буфер на основе трис-ацетата-этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) (ТАЕ) (4,86 г/л основания Trizma®, 0,37 г/л Na₂EDTA × 2H₂O, и 0,11% (об/об) уксусной кислоты при pH=8,3). Электрофорез проводили в течение 1 часа при 120 В с использованием источника питания для электрофореза EPS 3501 XL (GE Healthcare).

Мини-препарат

Для подтверждения правильности конструкций, полученных после клонирования, были проведены маломасштабные амплификации ДНК. Бактериальные колонии переносили в 3 мл или 5 мл среды LB (среды, содержащей соответствующий антибиотик Amp, 100 мкг/мл, или Kan, 50 мкг/мл, в зависимости от гена резистентности в представляющей интерес плазмиде) и культивировали в течение ночи при 37°C. Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием мини-набора I для получения плазмидной ДНК E.Z.N.A.® (D6943, Omega bio-tek). Вкратце, бактерии осаждали центрифугированием и ресуспендировали в растворе, содержащем РНКазу I (в буфере для ресуспендирования). Раствор II (буфера для лизиса) добавляли для высвобождения ДНК из клеток. Для прекращения реакции и осаждения геномной ДНК с клеточным дебрисом добавляли раствор III (буфер для нейтрализации). Преципитат осаждали центрифугированием и супернатант переносили в миниколонки с ДНК HiBind®. После связывания ДНК с колоночной мембраной путем центрифугирования и добавления буфера НВ, колонку два раза промывали буфером для промывки ДНК, а затем сушили. И наконец, плазмидную ДНК элюировали в буфере для элюирования.

Миди-препарат

Для получения ДНК с большим выходом и с большей степенью очистки, были получены миди-препараты из E. coli, после чего эти препараты культивировали в течение ночи в 100 мл среды LB (также содержащей соответствующий антибиотик) с использованием миди-набора NucleoBond® Xtra Midi (#740410, AN Diagnostics). Принцип получения этих препаратов аналогичен принципу получения мини-препаратов, за исключением того, что в данном случае, сначала проводили ресуспендирование и лизис бактерий. После нейтрализации, лизат загружали на уравновешенные колонки NucleoBond® Xtra и промывали уравновешивающим буфером. Встроенный в колонку фильтр, содержащий остаточный клеточный дебрис, удаляли и колонки промывали промывочным буфером. ДНК элюировали в буфере для элюирования, а затем осаждали в изопропанол. Осажденную ДНК осаждали центрифугированием и промывали 70% этанолом. После дополнительной стадии центрифугирования, супернатант удаляли, и

осадок ДНК сушили при комнатной температуре. ДНК восстанавливали в 100 мкл 10 мМ буферного раствора Трис-НСl (рН 8,0) или 100 мкл буфера для элюирования из мини-набора E.Z.N.A.[®] для получения плазмидной ДНК, после чего определяли концентрацию на NanoDrop™ 2000.

2.6. Производство вируса

Различные вирусы были произведены и протестированы в экспериментах (Таблица 2). Помимо обычных рекомбинантных аденовирусов были протестированы векторы Ad5, презентующие рекомбинантный рIX на своей поверхности (Ad5-рIX), и эти векторы получали с помощью отдельной процедуры.

Таблица 2: Список вирусных конструкций, используемых для иммунизации мышей. Также перечислены различные рекомбинантные аденовирусы, используемые в этих целях, включая сокращения, используемые в настоящем описании, и гены, кодируемые вирусом.

Вирус	Сокращения	Описание
Ad5_MelARVgag_p2A_envS TOP	Ad5-MelARV	Ad5, кодирующий MelARVgag и MelARVenv
Ad5_MelARVgag_p2A_envIS DmutSTOP	Ad5-MelARV- ISD	Ad5, кодирующий MelARVgag и ISD-мутированный MelARVenv
Ad5_MelARVgag_p2A_envS TOP_pIX-p15E	Ad5-MelARV_pIX- p15E	Ad5, кодирующий MelARVgag и MelARVenv, презентующие p15E на вирусном белке pIX
Ad5_MelARVgag_p2A_envIS DmutSTOP_pIX-p15E-ISD	Ad5-MelARV- ISD_pIX-p15E-ISD	Ad5, кодирующий MelARVgag и ISD- мутированный MelARVenv, презентующие ISD- мутированный p15E на вирусном белке pIX
Ad5_MelARVgag_p2A_envS TOP_pIX-p15E-trunc-wC	Ad5-MelARV_pIX- p15E-trunc-wC	Ad5, кодирующий MelARVgag и MelARVenv, презентующие усеченный p15E с дополнительным цистеином на вирусном белке pIX
Ad5_MelARVgag_p2A_envS TOP_pIX-p15E-trunc-w/oC	Ad5-MelARV_pIX- p15E-trunc-w/oC	Ad5, кодирующий MelARVgag и MelARVenv, презентующие усеченный p15E без дополнительного цистеина на вирусном белке pIX

Ad5_SIVgag_p2A_LucSP_MelARV_HA-TMCT	Ad5-LucSP_MelARV_HA-TMCT	Ad5, кодирующий SIVgag и модифицированный MelARVenv, содержащие сигнальный пептид люциферазы и трансмембранный домен гемаглютинаина вируса гриппа+цитоплазматический хвост
Ad5_SIVgag_p2A_LucSP_GC N4_p15E_HA-TMCT	Ad5-LucSP_GC N4_p15E_HA-TMCT	Ad5, кодирующий SIVgag и модифицированный MelARVenv, содержащие сигнальный пептид люциферазы, последовательность тримеризации и трансмембранный домен гемаглютинаина вируса гриппа+цитоплазматический хвост
Ad5_eGFP	Ad5-GFP	Ad5, кодирующий GFP

Последовательность белка Env MelARV с модифицированным ISD

Белок Env имеет следующую последовательность (SEQ ID NO: 41):

MESTTLSKPFKNQVNPWGPLIVLLILGGVNPVALGNSPHQVFNLSWEVTNGDRE
TVWAITGNHPLWTWWP
DLTPDLCMLALHGPSYWGLEYPAPFPPPGPPCCSGSSDSTSGCSRDC EEPLTSYT
PRCNTAWNRLKLSK
VTHAHNEGFYVCPGPHRPRWARSCGGPESFYCASWGCETTGRASWKPSSSWDY
ITVSNLTSQATPVCK
GNKWCNSLTIRFTSFGKQATSWVTGHHWGLRLYVSGHDPGLIFGIRLKITDSGP
RVPIGNPVLSDRPP
SRPRPTRSPPSNSTPTETPLTLPEPPPAGVENRLNLVKGAYQALNLTSPDKTQE
CWLCLVSGPPYYEG
VAVLGTYSNHTSAPANCSVASQHKLTLSEVTGQGLCIGAVPKTHQVLCNTTQKT
SDGSYYLVAPTGTWA
CSTGLTPCISTTILNLTTDYCVLVELWPRVTYHSPSYVYHQFERRAKYKREPVSLT
LALLGGLTMGGIA
AGVGTGTTALVATQQFQQLQAAMHDDLKEVEKSITNLEKSLTSLSEVVLQNR
GLDLLFLKRGGLCAFLK
EECCFYADHTGLVRDSMAKLRERLSQRQKLFESQQGWFEGLFNKSPWFTTLISTI
MGPLIILLLILFGP
CILNRLVQFIKDRISVVQALVLTQQYHQLKTIGDCKSRE

Последовательность была модифицирована путем замены исходного E на R, буквы на сером фоне в последовательности ISD, и A на F в третьем положении аминокислоты за пределами ISD, которые также отмечены серым.

Получение рекомбинантного Ad5

Исходной точкой продуцирования Ad5 является аденовирусная геномная плаزمида Capture-pBGN. Эта плаزمида содержит все гены, необходимые для образования инфекционных частиц Ad5, но из нее были удалены гены E1 и E3. E1 необходим для репликации вируса, и вместо него, используется клеточная линия-продуцент HEK293/Avtoxic (Kovesdi, I. and S.J. Hedley, Adenoviral producer cells. *Viruses*, 2010. **2**(8): p. 1681-703). E3 является геном, не играющим важной роли для продуцирования вируса, и он был удален из генома в целях создания пространства для рекомбинантных генов-мишеней. В процессе клонирования путем захвата (см. «0 Гомологичные рекомбинации для продуцирования рекомбинантных аденовирусных геномов»), эти гены-мишени встраивали в вектор посредством гомологичной рекомбинации. Этот способ клонирования белка-мишени в Capture-pBGN и последующее продуцирование вируса систематизированы на фиг. 5.

Av-токсические клетки трансфецировали рекомбинантным вектором Capture-pBGN. Для этой цели, клетки высевали в колбы для культивирования T75 и культивировали до 50-70%-ной конфлюэнтности. ДНК-вектор линеаризовали путем гидролиза рестриктирующим ферментом PI-SceI (#R0696S; New England BioLabs) в буфере PI-SceI в течение 1 часа при 37°C. Затем, проводили очистку фенолом-хлороформом, как описано в разделе «Клонирование путем захвата», и ДНК растворяли в OptiMEM (#11058-021; Invitrogen). Часть раствора ДНК загружали на 1% агарозный гель для подтверждения правильного разрезания плазмиды. Остаточную ДНК смешивали с полиэтиленимином (ПЭИ) в отношении ДНК:ПЭИ 1:3. После инкубирования в течение 15 минут при комнатной температуре, смесь по каплям добавляли к среде Av-токсических клеток. Трансфецированные клетки инкубировали в нормальных условиях культивирования клеток (см. «**Ошибка! Источник ссылки не найден.** Культивирование клеток») с заменой среды через 16 часов, а затем через каждые 2-3 дня. Если лизис клеток наблюдался при отслаивании клеток (через 2-3 недели), то среду для культивирования клеток, содержащую лизированные клетки (называемые «вирусным лизатом»), собирали и хранили при -80°C.

В следующей стадии, клетки повторно инфицировали «вирусным лизатом» с получением «3-дневного лизата». Для этой цели, Av-токсические клетки культивировали в 6-луночном планшете до 70% конфлюэнтности и инфицировали от лунки к лунке в серийном разведении «вирусного лизата» 1:10. Через три дня после инфицирования, супернатант из большинства лунок с разведенным полным лизисом собирали и замораживали при -80°C. Этот вирусный образец был назван «3-дневным лизатом».

Для продуцирования вируса в больших масштабах («крупномасштабного лизата»), Av-токсические клетки высевали в четыре колбы TripleFlasks™, обработанные клеточной культурой Nunc™ (500 см²) (#132913; Thermo Fisher). Когда клетки достигали 70% конфлюэнтности, колбы инфицировали 150 мкл «3-дневного лизата». После полного лизиса клеток (приблизительно через три дня), супернатант собирали и замораживали при

-80°C.

Очистка рекомбинантного Ad5

В первой стадии очистки вируса, 0,5% Igepal CA-630 (#56741; Sigma-Aldrich) добавляли к собранным крупномасштабным лизатам. В течение 10-минутного инкубирования при комнатной температуре, детергент вызывал разрушение оставшихся клеток и высвобождал содержимое вируса в среду. Для удаления остатков клеток, лизат центрифугировали при $12186 \times g$ в течение 20 минут при 4°C. Супернатант извлекали и добавляли половину объема в виде 20% полиэтиленгликоля (ПЭГ) + 2,5 М раствора NaCl, а затем осторожно встряхивали в течение ночи при 4°C. На этой стадии, вирус в супернатанте осаждали, что приводило к концентрированию вируса в следующей стадии. Осажденный вирус собирали центрифугированием при $12186 \times g$ в течение 20 минут. Вирусный осадок ресуспендировали в 5 мл охлажденного забуференного фосфатом физиологического раствора (PBS) и переносили в 15 мл-пробирки Falcon. Образец центрифугировали при $784 \times g$ в течение 5 минут для удаления остального клеточного остатка. Супернатант переносили в свежую 15 мл-пробирку Falcon, и предыдущую стадию центрифугирования повторяли несколько раз, до тех пор, пока в пробирке не оставался небольшой осадок клеточного остатка, который не удалялся полностью. Почти насыщенный раствор CsCl добавляли к вирус-содержащему супернатанту до достижения конечной плотности 1,34 г/мл. Полученный раствор переносили в ультрацентрифужную пробирку (#342413; Beckman Coulter), которую затем герметично закрывали и центрифугировали в течение ночи на роторе Beckman Coulter Ti 70.1 при $257300 \times g$. Отчетливо наблюдаемую полосу вируса экстрагировали с помощью иглы шприца и загружали в уравновешенную обессоливающую колонку PD-10 (# 17-0851-01; GE Healthcare). Проточные фракции собирали в 70% глицерине с конечной концентрацией глицерина 10%. Фракции с самой высокой концентрацией вируса (с высокой мутностью) объединяли, разделяли на аликвоты и хранили при -80°C. Вирусные аликвоты не оттаивали и замораживали более, чем два раза.

Получение и очистка рекомбинантных векторов Ad5, презентующих антигены на рIX

Продуцирование вирусов Ad5-pIX осуществляли с применением стратегии, отличающейся от стратегии продуцирования обычных рекомбинантных вирусов Ad5. Клеточная линия-продуцент представляет собой ранее описанную клеточную линию НЕК293(CCS)-shmir-pIX_221-puro (pIX-клетки). pIX-клетки высевали в 175 см^2 -колбы (четыре колбы на вирус) и культивировали до 70% конфлюэнтности. Для получения рекомбинантных белков pIX, клетки трансфецировали плазмидой pсDNA3_pIX, в которой pIX был связан с рекомбинантным белком посредством генетического сцепления. Доксициклин добавляли к культуральной среде (0,5 мкг/мл) до трансфекции, что приводило к индуцированию транскрипция pIX-специфической кшРНК, которая ингибировала трансляцию нативного pIX. Среду для культивирования клеток заменяли через 18 часов после трансфекции и снова добавляли доксициклин. Затем, клетки

инфицировали при MOI 5 (множественности заражения) соответствующего основного аденовируса (аденовируса, кодирующего представляющий интерес рекомбинантный белок). Репликация вируса осуществлялась в течение 48 часов в обычных условиях культивирования до тех пор, пока не наблюдался цитопатический эффект вируса. Клетки собирали и осаждали центрифугированием при $750 \times g$ в течение 10 минут. Осадок ресуспендировали в PBS с 0,5% деоксихолатом натрия и инкубировали 30 минут при комнатной температуре для разрушения клеток и высвобождения вирусов. Для гидролиза геномной ДНК в клеточной линии-продуценте добавляли 0,2 М $MgCl_2$ и 0,05 мг/мл ДНКазы I (A3778, AppliChem) и инкубировали в течение 1 часа при $37^\circ C$. Клеточный дебрис удаляли путем центрифугирования при $3000 \times g$ в течение 15 минут и к вирус-содержащему супернатанту добавляли CsCl до конечной концентрации 1,34 г/мл. Вирусы ультрацентрифугировали в градиенте CsCl, как описано выше для очистки Ad5. Экстрагированную вирусную полосу переносили на диализную мембрану (диализную мембрану Spectra/Por[®], 300 кДа, # 131450, система пробирок Biotech CE) и диализовали в течение ночи в PBS при $4^\circ C$. И наконец, вирус разделяли на аликвоты в 10% глицерине и хранили при $-80^\circ C$.

Титрование вируса

Для воспроизводимости экспериментов, очищенные вирусы титровали для получения числа инфекционных единиц на мл (ИЕ/мл). Обработанную поверхность 96-луночных планшетов с плоскодонными Δ -образными лунками покрывали полилизинном в течение 15 минут и три раза промывали PBS. Клетки НЕК293 высевали в лунки в концентрации 5×10^4 клеток в 100 мкл культуральной среды. Вирус разводили путем 10-кратного серийного разведения в культуральной среде, начиная с разведения 1:50. 50 мкл раствора для разведения 5×10^4 - 5×10^7 добавляли в дубликатах к клеточным суспензиям в 96-луночном планшете. Инфицированные клетки инкубировали в течение 48 часов в обычных условиях культивирования клеток. После удаления среды, лунки сушили при комнатной температуре, и клетки фиксировали в холодном метаноле в течение 10 минут при $-20^\circ C$. Затем лунки три раза промывали PBS, содержащим 1% альбумин бычьей сыворотки (BSA). Для детектирования инфицированных вирусом клеток добавляли антитела против гексона Ad5 (1E11; # sc-51746; Santa Cruz Biotechnologies) при разведении 1:1000 в PBS+BSA и инкубировали в течение 1 часа при $37^\circ C$. После трехкратной промывки PBS+BSA, «вторые» антитела против мышинных иммуноглобулинов, конъюгированные с пероксидазой хрена (ПХ), (#P0447; Dako), разводили 1:500 в PBS+BSA, и инкубировали в лунках в течение 1 часа при $37^\circ C$. Остаточные антитела смывали и вирусные бляшки визуализировали с использованием субстрата 3,3'-диаминобензидина (DAB) при комнатной температуре в течение 10 минут.

Для определения титра вируса, бляшки при соответствующем разведении подсчитывали под микроскопом с увеличением $20\times$. Несколько полей зрения подсчитывали в каждой лунке до тех пор, пока не было детектировано приблизительно 100 бляшек. Конечное число ИЕ на мл вычисляли по следующим формулам:

$$\begin{aligned}
 & - \\
 & P * VF * DF * W \\
 & = P * 52,7 \text{ полей зрения/лунку} * DF * 20 \text{ лунок/мл} \\
 & = P/\text{мл} = \text{ИЕ/мл}
 \end{aligned}$$

—
P—среднее число бляшек на поле зрения (общее количество подсчитанных бляшек/подсчитанные поля зрения); *VF*—число полей зрения на лунку с 20-кратным увеличением (52,7 полей зрения/лунку); *DF*—коэффициент разведения вируса в подсчитанных лунках (например, 500000 ×); *W*—число инфицированных лунок на мл разведения вируса (1000 мкл/мл/50 мкл/лунку=20 лунок/мл); *P*—число бляшек.

Для дополнительной оценки контроля качества, измеренную концентрацию инфекционных единиц на мл (ИЕ/мл) сравнивали с количеством вирусных частиц (VP). VP/мл определяли на NanoDrop™ 2000 путем измерения оптической плотности на 260 нм. Оптическая плотность 1 единицы соответствует концентрации 10¹² VP/мл. Отношение ИЕ/мл к VP/мл указывает на жизнеспособность вируса при идеальном/типичном отношении 1:30-1:100.

Очистка геномной ДНК из рекомбинантного Ad5

Выделение ДНК из рекомбинантных аденовирусов проводили для гарантии правильного встраивания рекомбинантных генов в геном аденовируса. ДНК экстрагировали с помощью набора для получения мини-препаратов геномной ДНК млекопитающих GenElute™ (G1N70, Sigma-Aldrich) в соответствии с измененным протоколом. Для этой цели, 100 мкл очищенного образца вируса смешивали с 100 мкл раствора для ресуспендирования. Затем добавляли протеиназу К и раствор для лизиса С и инкубировали в течение 10 минут при 70°C. После добавления 96% этанола, раствор загружали на препаративную колонку для связывания GenElute Miniprep. Последующие стадии осуществляли в соответствии с исходным протоколом с двумя стадиями промывки и последующей сушки колонки. Вирусную ДНК элюировали в растворе для элюирования. Для гарантии качества вируса, ДНК отправляли для секвенирования (GENEWIZ UK Ltd.), чтобы исключить мутации в области гомологичной рекомбинации. Кроме того, вирусную ДНК разрезали рестриктирующими ферментами для подтверждения правильных размеров полос с помощью гель-электрофореза.

Получение и очистка VLP

Получение и очистку вирусоподобных частиц (VLP) осуществляли, главным образом, для анализа функциональных свойств VLP-кодирующих вакцин. Продуцирование VLP тестировали в клетках Vero, которые были засеяны при плотности 1×10⁷ клеток в 175 см²-колбы для культивирования, и инкубировали в течение 2 часов для связывания. Затем, клетки были инфицированы 50 MOI Ad5 (5×10⁸ ИЕ/колбу) в течение 5 часов. После удаления культуральной среды, клетки два раза промывали PBS и инкубировали в течение 48 часов в бессывороточной среде. Супернатант (SN) центрифугировали при 282× g в течение 10 минут и фильтровали через 0,45 мкм-

мембрану для удаления примесных клеток. VLP очищали путем осаждения через 20% сахарозную подушку при $82700 \times g$ на роторе Beckman Coulter Ti 70 с использованием открытых 32 мл-пробирок с толстыми стенками (#355631; Beckman Coulter). SN удаляли, и осадок ресуспендировали в 100 мкл PBS (160x от исходной концентрации).

Adv-вакцину, кодирующую HERV-K-Gag-P2A-Env дикого типа (WT)/ISDmut, транслировали в функциональные белки, способные продуцировать VLP, а затем клеточный лизат получали из инфицированных клеток, и VLP очищали от супернатанта клеточной культуры (SN).

Клеточные линии Vero, A549 и HEK293 были использованы для продуцирования и очистки VLP. 10×10^6 клеток Vero, 10×10^6 клеток A549 или 10×10^5 клеток HEK293 высевали на день 1 в колбы T175 (175 см^2) или, в случае клеток HEK, в колбы T25 (25 см^2), содержащие соответствующую среду. Через 2 часа, клетки инфицировали различными вирусными векторами, кодирующими представляющие интерес последовательности согласно изобретению, (см. Таблицу 2b) при множественности заражения (MOI) 50 или 20 (HEK293), которая означает количество вирионов/клеток для данной инфекции. Через 5 часов, клетки два раза промывали забуференным фосфатом физиологическим раствором (PBS), содержащим 8 г/л NaCl, 0,2 г/л KCl, 1,15 г/л $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 г/л KH_2PO_4 при pH 7,4. Затем среду заменяли соответствующей клеточной средой, но без FBS. Клетки инкубировали в оптимальных условиях хранения в течение 48 часов, или 16 часов при использовании клеток HEK293.

После этого, для получения VLP из клеточных культур проводили две различных процедуры. С одной стороны, SN использовали для очистки и анализа секретируемых клетками VLP. С другой стороны, клетки лизировали для анализа VLP, содержащихся в клетках.

Для проведения первой процедуры, клетки центрифугировали при 12000 оборотов в минуту в течение 10 минут при 4°C , и супернатант фильтровали через 0,45 мкм-мембрану (Sartorius, 16555) для удаления клеточных примесей. 13,5 мл SN по каплям добавляли к 3 мл 20% (масс/об) сахарозы, растворенной в PBS, в открытых ультрацентрифужных 32 мл-пробирках с толстыми стенками (Beckman Coulter, 355631). Эти пробирки взвешивали для подтверждения равного объема и помещали в ротор Ti 70 (Beckman Coulter, 337922), который был помещен в ультрацентрифужное устройство, работающее при $82700 \times g$, 4°C в течение 2,5 ч. По окончании этой процедуры, SN осторожно удаляли, и оставшийся осадок ресуспендировали в 100 мкл PBS и хранили при -20°C .

Вторая процедура состояла из первой стадии промывки холодным PBS. Затем, в колбы добавляли 10 мл холодного PBS, и клетки механически соскабливали. 4 мл переносили в коническую 15 мл пробирку и центрифугировали при 12000 оборотов в минуту в течение 5 минут при 4°C . SN отбрасывали, и в каждую пробирку добавляли 1300 мкл смеси, содержащей буфер для лизиса клеток NP40 (Invitrogen, FNN0021) вместе с 7 мкл/мл смеси ингибиторов протеазы (Sigma-Aldrich, P8340). Затем пробирки оставляли на

льду на 30 минут при вихревом перемешивании через каждые 10 минут с помощью шейкера для стряхивания 3 (ИКА). И наконец, пробирки центрифугировали при 13000 оборотов в минуту в течение 10 минут при 4°C для удаления клеточного дебриса, а SN переносили в новые пробирки и хранили при -20°C.

Таблица 2б. Список аденовирусов, кодирующих различные конструкции, используемые для анализа и сравнения продуцирования и экспрессии VLP.

Код	Вектор и последовательность
LA512	Ad5-(TetO)-CMV-Ii-fur-HB3var03-IT4var20
LA551	Ad5-(TetO)-CMV-SIVgag_p2A_LucSP_Syncytin1_HA-TMCT
LA546	Ad5-(TetO)-CMV-SIVgag_p2A_HERV-K108env_P2TS
Ad19_HERV-K	Ad19a(II)-(TetO)-CMV-coHERV-K-P2TS
Ad19_HERV-K_ISD	Ad19a(II)-(TetO)-CMV-ISDmut_coHERV-K-P2TS
Ad19_MelARV	Ad19a(II)-(TetO)-CMV-MelARV-P2TS
Ad19_MelARV_ISD	Ad19a(II)-(TetO)-CMV-ISDmut_MelARV-P2TS

Продуцирование и титрование MVA

Процедуру продуцирования, очистки и титрования MVA проводили в соответствии с инструкциями, описанными Staib et al. 2004. Исходный MVA, экспрессирующий посевной лизат белка Gag или Env HERV-K, используемый для проведения этого эксперимента, был предоставлен профессором Dr. Barbara Schnierle (Langen, Germany). Перед крупномасштабным продуцированием MVA с использованием 175 см²-колб, количество вируса увеличивали в небольшом масштабе также с использованием 175 см²-колб, которые, в обоих случаях, были засеяны клетками CEF.

В этом случае, титрование MVA проводили в клетках ВНК-21. Для детектирования инфицированных клеток использовали «первое» поликлональное кроличье антитело против вируса осповакцины (BioRad, 9503-2057), разведенное 1:1000, и «второе» ПХ-конъюгированное поликлональное козье антитело против кроличьих Ig (Dako, p0448), разведенное 1:500. Для определения титра (ИЕ/мл), количество окрашенных очагов подсчитывали на образце, разведенном приблизительно 20-100 вирусными бляшками/лунку, для обеспечения максимальной точности.

Эксперименты на животных

6-8 недельных самок мышей C57BL/6, BALB/C и CD1 получали от Taconic (C57BL/6) или Envigo (Balb/C и CD1). Мышей оставляли для акклиматизации в течение одной недели до начала эксперимента. Все эксперименты проводили в соответствии с национальными рекомендациями и экспериментальными протоколами, утвержденными

Национальными Органами по контролю за проведением экспериментов на животных (DyreforsØgstilsynet, Дания).

Выделение проб сыворотки крови

Для получения проб сыворотки, у мышей брали приблизительно 10% от общего объема крови из лицевой вены путем пункции с помощью ланцета Goldenrod.

Альтернативно, для окончательного забора крови (полного забора) у мышей, этих мышей анестезировали путем внутрибрюшинной (i.p.) инъекции 1 мг/мл ксилазина и 10 мг/мл кетамина в PBS в дозе 100 мкл на 10 г мыши. Максимальный объем крови брали из лицевой вены путем пункции, а затем мышей умерщвляли путем смещения шейных позвонков.

В экспериментах с использованием HERV-K, для полного забора крови путем сердечной пункции, мышам делали полную анестезию изофлураном. Сразу после этого, мышей помещали мордой вверх с лицевой маской, в которую непрерывно подавали изофлуран, и делали сердечную пункцию с использованием иглы 1 мл-шприца калибра 27. Было взято приблизительно 800-1000 мкл крови, после чего мышей умерщвляли путем смещения шейных позвонков.

Альтернативно, мышам делали полную анестезию изофлураном. Затем, их тестировали на произвольные рефлексы и, только убедившись, что они отсутствуют, из глаза, а в частности, из орбитального синуса, брали максимальный объем крови. Затем мышей сразу умерщвляли путем быстрого смещения шейных позвонков.

Пробы крови хранили в течение ночи при 4°C для свертывания крови, и клетки крови удаляли из сыворотки с помощью двух центрифугирований при 800× g в течение 10 минут. После этого, сыворотку хранили при -20°C.

Инъекции: i.v., s.c., i.m., i.p.

Были проведены различные процедуры инъекции. Для внутривенной (i.v.) инъекции, мышей разогревали в нагревательной камере для увеличения поверхностного венозного кровотока. Максимум 200 мкл инъецировали в хвостовую вену. В экспериментах с HERV-K, мышам внутривенно инъецировали объем 100 мкл, включающий 10⁶ Gag- и Env-содержащих клеток RLZ (от B. Schnierle), для индуцирования метастазов в легкие.

Подкожную (s.c.) инъекцию в подушечку лапы (f.p.) проводили при анестезии изофлураном путем инъекции 30 мкл под кожу подушечки лапы. Для экспериментов с использованием HERV-K, инъекцию такого типа проводили для введения 10⁶ Gag- и Env-содержащих клеток RLZ (от B. Schnierle) (в 100 мкл) для роста подкожных опухолей у мышей и создания мышинной модели опухоли, экспрессирующей Env HERV-K.

Для внутримышечной (i.m.) инъекции, в мышцу бедра вводили максимальный объем 60 мкл.

При проведении экспериментов с использованием HERV-K, инъекцию этого типа проводили, главным образом, для иммунизации (примирования) и бустер-иммунизации мышей представляющими интерес вакцинами (см. ниже Таблицу 2с). 50 мкл на мышь

использовали для вакцинации/бустер-вакцинации аденовирусами или MVA, соответственно. Инъекцию делали в мышцу бедра под анестезией изофлураном, которая дает обезболивание и расслабление мышц.

Таблица 2с. Вирусные вакцины, используемые для i.m.-иммунизации мышей.

Вирус	ИЕ/мышь	Тип вакцинации
Ad19a(II)-(TetO)-Hiso-MfPV3-P2TS (IP1321_A2953_V_7b) от Sirion	1×10^8	Первичная
Ad5-(TetO)-CMV-SIVgag_p2A_HERV-K108env_P2TS	1×10^8	Первичная
Ad19a(II)-(TetO)-CMV-coHERV-K-P2TS от Sirion	1×10^8	Первичная
Ad19a(II)-(TetO)-CMV-ISDmut_coHERV-K-P2TS от Sirion	1×10^8	Праий/Буст
MVA, экспрессирующий белок Env HERV-K	1×10^7	Праий/Буст
ДНК-(TetO)-CMV-ISDmut_coHERV-K-P2TS	1 мкг/мкл	Праий/Буст

Внутрибрюшинную (i.p.) инъекцию проводили путем введения до 500 мкл в брюшную полость.

Вакцинации

5 различных испытаний вакцин проводили на мышах:

Схема вакцинация I. Мышей Balb/C вакцинировали по схеме «прайм-буст» путем проведения двух вакцинаций ДНК с последующей одной вакцинацией Ad5, или вакцинацией либо ДНК, либо Ad5. В качестве контроля, мышам инъецировали PBS. Через четыре недели после вакцинации Ad5, брали пробы крови, и у некоторых мышей выделяли селезенку. Затем, мышей подвергали контрольному заражению путем подкожного введения опухолевых клеток CT26 в правый бок и оценивали рост опухоли.

Схема вакцинация II. Мышей Balb/C подвергали контрольному заражению путем подкожного введения опухолевых клеток CT26. Мышей вакцинировали Ad5-MelARV либо на день 2 после заражения (день 2 после заражения), либо на день 5 после заражения (путем предварительного введения первичной дозы ДНК). Кроме того, одну группу вакцинировали на день 2 после контрольного заражения, а затем вводили четыре инъекции анти-PD1 антител вскоре после того, как опухоли были пальпируемыми (день 8 после контрольного заражения). Мышам контрольных групп инъецировали только PBS или анти-PD1 антитело.

Схема вакцинация III. Мышей C57BL/6 вакцинировали по схеме «прайм-буст» путем введения двух инъекций ДНК-MelARV, с последующей вакцинацией Ad5. Пробы крови брали через 3 недели после последней вакцинации, и мышей внутривенно заражали 2×10^5 клеток B16F10-GP. Число метастазов в легких определяли через две недели после заражения.

Схема вакцинация IV. Мышей CD1 вакцинировали сначала ДНК- плазмидами, кодирующими MelARVgag_p2A_env (ДНК-MelARV) или ISD- мутированный вариант MelARVgag_p2A_env_ISD (ДНК-MelARV-ISD). После первого введения ДНК проводили вакцинацию аденовирусами Ad5-MelARV или Ad5-MelARV-ISD. Пробы крови брали через четыре недели после вакцинации и анализировали на сывороточные антитела.

Схема вакцинация V. Мышей C57BL/6 вакцинировали два раза аденовирусами, либо Ad5-MelARV_pIX-p15E, либо Ad5-MelARV. Ad5-GFP использовали в качестве контроля. Затем брали пробы крови и мышей внутривенно заражали 2×10^5 клеток B16F10-GP. Легкие выделяли через две недели после заражения и анализировали на метастазы.

Для ДНК-вакцинации, 50 мкл ДНК в 50 мкл Трис/PBS (142 мМ) внутримышечно вводили путем инъекции. Аденовирусы вводили в количестве 2×10^8 ИЕ в 30 мкл PBS в подушечку лапы. В экспериментах, проводимых с использованием рIX-модифицированных вирусов (по схемам вакцинации IV и V), 10^{10} вирусных частиц в 60 мкл PBS инъецировали внутримышечно. Из-за низких концентраций рIX-вирусов, инъекция небольшого объема в подушечку лапы была невозможна.

Другой эксперимент включал введение анти-PD1 антител (RMP1-14; #BE0146; BioXCell) мышам, зараженным опухолью (см. «Заражение опухолью 0»). 200 мкг анти-PD1 антитела внутрибрюшинно вводили в 200 мкл PBS. Лечение начинали на 8-й день после заражения опухолью, когда рост подкожных опухолей был очевидным. Инъекции мышам проводили четыре раза на каждый четвертый день (день 8, 12, 16 и 20 после заражения опухолью) (Kim, K., et al., Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(32): p. 11774-9 and Shindo, Y., et al., Combination immunotherapy with 4-1BB activation and PD-1 blockade enhances antitumor efficacy in a mouse model of subcutaneous tumor. Anticancer Res, 2015. **35**(1): p. 129-36).

В экспериментах с использованием HERV-K, бустер-инъекцию Adv и/или MVA проводили приблизительно через 4 или 8 недель после введения первой дозы вакцины на основе Adv или ДНК (день 0). Пробы крови брали до и после первой вакцинации (день 14). У мышей также брали кровь на 14 и 28 дни после введения бустер-дозы MVA/Adv/ДНК. Пробы крови использовали для анализа гуморальных ответов (продуцирования антител против Env HERV-K) у вакцинированных мышей. Затем, мышей умерщвляли через 10 дней после введения бустер-дозы MVA для тестирования клеточных иммунных ответов (продуцирования $CD8^+$ -T-HERV-K Env-специфических Т-клеток).

Для тестирования терапевтических эффектов новой стратегии вакцинации, через 10 дней после заражения опухолью вводили только одну дозу вакцины.

Заражение опухолью

Для оценки метастазирования клеток B16F10-GP *in vivo*, культивированные клетки три раза промывали PBS и раздвляли путем инкубирования в версене в течение 15 минут при 37°C. Затем, клетки центрифугировали при 282× g, промывали PBS и разводили до концентрации 2×10⁶ клеток/мл в PBS. 2×10⁵ клеток в 100 мкл PBS вводили внутривенно в хвостовую вену мышей, что приводило к образованию метастазов опухоли в легких. Зараженных мышей умерщвляли через 14 дней. Легкие выделяли и фиксировали в течение ночи в растворе 2% параформальдегида (PFA) в PBS с последующим хранением в PBS при 4°C. Метастазы подсчитывали как черные узелки на поверхности легких под разделяющим микроскопом. Образцы были взяты вслепую и метастазы были подсчитаны по меньшей мере двумя экспериментаторами.

Для анализа первичного роста опухолей CT26, клетки CT26 получали как описано для клеток B16F10-GP и разводили до концентрации 5×10⁶ клеток/мл в PBS. Подкожная инъекция в правое бедро 5×10⁵ клеток в 100 мкл PBS приводила к образованию опухоли в месте инъекции. Размер опухоли измеряли три раза в неделю по длине и ширине. Объем опухоли определяли по формуле: *длина * ширина² * 0,5236* (Janik, P., et al., The Effect of Estrone-Progesterone Treatment on Cell Proliferation Kinetics of Hormone-dependent GR Mouse Mammary Tumors. Cancer Research, 1975. 35(12): p. 3698-3704). Мышей умерщвляли, когда опухоль превышала 16 мм на любой стороне, и когда появились некротические раны или заметно снижалась подвижность мышей. Во время измерения опухоли, различные вакцинированные группы были использованы вслепую для предотвращения смещенной оценки.

Помимо CT26-заражения, мышам Balb/C инъецировали 2,5×10⁴ клеток 4T1-Luc в 100 мкл PBS в грудную жировую ткань молочной железы. Для визуализации образования опухоли через 6 недель, мышам внутрибрюшинно вводили люциферин (1,5 мг на 10 г мыши) и визуализировали через 12 минут после инъекции с использованием визуализирующей системы IVIS Spectrum *in vivo*. Визуализация IVIS проводилась Andreea-Cornelia Udrea и Melanie Schwerdtfeger.

Для анализа роста опухоли и метастазирования Gag и Env-содержащих клеток RLZ *in vivo*, клетки культивировали до 60-80%- конfluence. После достижения желаемой конfluence, клетки RLZ три раза промывали PBS, а затем добавляли версен в течение 15 минут при 37°C для отделения клеток. Затем клетки центрифугировали при 282× g, промывали PBS, и наконец, разводили до 10⁷ клеток/мл в PBS. Каждой мыши внутривенно инъецировали 10⁶ клеток/100 мкл для образования метастазов в легких, и подкожно, для образования подкожных опухолей. Для оценки метастазов в легких, мышей взвешивали на дни 0, 7 и 14, а затем через каждые 2 дня. Если мыши теряли приблизительно 15-20% массы в течение нескольких дней, то их умерщвляли. Конечная точка для прекращения эксперимента была установлена на 40-й день после заражения опухолью. Мышей с подкожными опухолями оценивали в то же самое время, как и *i.v.*-зараженных мышей, и умерщвляли, когда диаметр опухоли превышал 16 мм.

Подкожные опухоли и легкие выделяли и погружали в 4% параформальдегид (PFA) и фосфатный буфер, 0,01 моль/л при pH=7,2 (Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark) и хранили при 4°C. Образцы обрабатывали и ткани анализировали на HERV-K Env-специфическое окрашивание с использованием высоких титров сыворотки от вакцинированных мышей.

Вестерн-блоттинг

Для обнаружения рIХ-белков, клеточные лизаты (~10 мкг) или очищенные вирусы (10^{10} вирусных частиц) смешивали с $6 \times$ ДСН-загрузочным буфером, содержащим DDT, и нагревали в течение 5 минут при 95°C. Для выявления экспрессии белков MeIARV, клеточные лизаты (5 мкг), клеточный супернатант (15 мкг) и очищенные VLP (~2 мкг) аналогичным образом смешивали с DDT-содержащим загрузочным буфером, но без нагревания образцов. Смесь загружали на 4-12% бис-Трис-гель с белком, NuPAGE™ (#NP0322, Thermo Fisher) и проводили электрофорез в течение 1 часа при 150 В в буфере MOPS. Содержание белка в геле подвергали блоттингу во влажной системе для переноса на нитроцеллюлозную мембрану в течение 1 часа при 30 В.

После переноса, мембрану блокировали в течение 1 часа 5% сепарированным молоком в Трис-забуферном физиологическом растворе+Твин 20 (TBS-T). Затем мембрану три раза промывали TBS-T в течение 10 минут на шейкере и инкубировали с «первым» разведенным антителом (Таблица 3) (в TBS-T+3% сепарированное молоко) в течение ночи при 4°C. После трех дополнительных стадий промывки добавляли ПХ-конъюгированное «второе» антитело в TBS-T и мембрану инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Несвязанное «второе» антитело смывали и белок-мишень визуализировали с использованием хемилюминесцентного субстрата LumiGLO Reserve (54-61-00 или 54-71-02) в ImageQuant LAS 4000.

Таблица 3: Список «первых» и «вторых» антител, используемых для Вестерн-блоттинга и ELISA. В таблице перечислены различные «первые» антитела, используемые для вестерн-блоттинга, и их происхождение. Кроме того, показаны используемые разведения и «вторые» антитела, выбранные для детектирования. Некоторые антитела были также использованы для ELISA-анализа при разведениях, описанных ниже.

«Первое» антитело	Номер/происхождение продукта	Разведение	«Второе» антитело
Анти-р2А антитело	#ABS31; Millipore	1:1000	ПХ-конъюгированное антитело против кроличьих Ig (#P0448, Dako)
MM2-9B6	20× супернатант клеточной культуры из гибридом (взятых у Tsuyoshi Takami,	1:200	ПХ-конъюгированное антитело против мышинных Ig (#P0447, Dako)

	University of Arizona Health Sciences Center)		
4F5	Концентрированный супернатант клеточной культуры из гибридом (взяты у George Cianciolo, Duke University Medical Center)	1:200	ПХ-конъюгированное антитело против мышинных Ig (#P0447, Dako)
19F8	Концентрированный супернатант клеточной культуры из гибридом (взяты у George Cianciolo, Duke University Medical Center)	1:200	ПХ-конъюгированное антитело против мышинных Ig (#P0447, Dako)
анти-pIX антитело	Антитело, продуцированное у кроликов (взятое у David T. Curiel, Washington University in St.Louis)	1:1000	ПХ-конъюгированное антитело против кроличьих Ig (#P0448, Dako)

В экспериментах с использованием HERV-K, экспрессию VLP на уровне белка анализировали методом WB. Для гарантии равной загрузки образцов, концентрацию белка в VLP (SN) и в клеточных лизатах измеряли с помощью набора для анализа белка с использованием бицинхониновой кислоты Pierce™ (BCA) (Thermo Fisher Scientific, 23225) в соответствии с инструкциями производителя. К различным образцам добавляли 6× загрузочный буфер с додецилсульфатом натрия (ДСН), содержащий дитиотреитол (ДТТ), и образцы помещали в нагревательный блок SBH130DC (Stuart) при 95°C на 5 минут. Затем, 5 мкг белка, а также 7 предварительно окрашенного маркера RunBlue™ (Expedeon, NXA05160) загружали в 4-12% бис-Трис-гель с белком NuPAGE™ (Thermo Fisher Scientific, NP0322) вместе с рабочим буфером, содержащим MOPS-ДСН NuPAGE™ (Thermo Fisher Scientific, NP0001). Образцы разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с ДСН (ДСН-ПААГ) в течение 45 минут при 180 В.

Затем образцы переносили на нитроцеллюлозную 0,45 мкм-мембрану для

блоттинга (Bio-Rad, 1620115) при 30 В в течение 45 минут. В этой стадии использовали буфер для переноса (3,75 г/л основания Trizma[®], 18,1 г/л глицина при pH 8,5) с 20%-ным этанолом.

Для предотвращения неспецифического связывания, мембрану блокировали в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ) с использованием 5% (масс/об) сухого сепарированного молока в Трис-забуференном физиологическом растворе с Твином (TBS-T) (6,06 г/л основания Trizma[®], 8,76 г/л NaCl, 0,25% (об/об) Твина-20 при pH 7,6). После этого, мембрану промывали TBS-T в течение 10 минут, и инкубировали с соответствующими «первыми» антителами (см. Таблицу 3а) в 3% (масс/об) сухого сепарированного молока в TBS-T на шейкере CERTOMAT[®] MO II (Sartorius) при 4°C в течение ночи (o/n).

Таблица 3а. Список «первых» специфических антител, используемых для детектирования белков VLP.

Антитело	Разведение	Источник
Поликлональное кроличье антитело против пептида 2А (Gag)	1:1000	Millipore, ABS31
Моноклональное мышинное антитело (IgG) против белка оболочки (p15E, TM) человеческого эндогенного ретровируса типа К (HERV K)	1:8000	Austral Biologicals, HERM-1811-5
Моноклональное мышинное антитело (IgG) против белка оболочки (gp70, SU) человеческого эндогенного ретровируса типа К (HERV K)	1:2000	Austral Biologicals, HERM-1821-5

Затем мембрану три раза промывали TBS-T в течение 10 минут. После этого, ее инкубировали с соответствующим «вторым» антителом (см. Таблицу 3б), разведенным в TBS-T в течение 1 часа при комнатной температуре.

Таблица 3б. Список ПХ-конъюгированных «вторых» антител, используемых для WB.

Антитело	Разведение	Источник
ПХ-конъюгированное поликлональное козье антитело против кроличьих Ig	1:2000	Dako, P0448
ПХ-конъюгированное поликлональное кроличье	1:2000	Dako, P0260

антитело против мышинных Ig.		
------------------------------	--	--

Затем мембрану 3 раза промывали (каждый раз по 10 минут) TBS-T. Пероксидазный хемилюминесцентный субстрат (KPL, 54-61-00) использовали для детектирования белков в камере ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences).

Твердофазный иммуоферментный анализ (ELISA)

Для детектирования MelARV-специфических антител у вакцинированных мышей, пептиды субъединицы p15E Env MelARV, конъюгированной с BSA, закупили у Schafer-N (Копенгаген, Дания).

Таблица 4: Описание пептида, используемого для ELISA. В таблице описан пептид, используемый в целях покрытия ELISA-планшета для анализа гуморальных ответов у мышей. Далее подробно описаны происхождение белка (белка-мишени), локализация пептида в белке-мишени (область) и последовательность.

Название пептида	Белок-мишень	Область	Последовательность
MelARVp15E(94-136)	MelARV p15E	Между ISD и трансмембранным доменом (94-136)	CFYADHTGLVRDSMAKLRER LSQRQKLFESQQGWFEGLFN KSP (SEQ ID No: 42) (конъюгированная с BSA)

Плоскодонные планшеты MaxiSorp (Thermo Fisher) покрывали в течение ночи при 4°C 100 мкл раствора пептида (2 мкг/мл в PBS) на лунку, а затем два раза промывали промывочным буфером (PBS+2,07% NaCl+0,1% Твина-20). Лунки блокировали буфером для разведения (PBS+2,07% NaCl+0,05% BSA+0,05% Твина-20) в течение 2 часов при 37°C, один раз промывали промывочным буфером и инкубировали с разведенной мышинной сывороткой (1:50 в буфере для разведения) в течение 3 часов при 37°C. После двух промывок, связанные с пептидом сывороточные антитела инкубировали с ПХ-конъюгированным козьем антителом против мышинных иммуноглобулинов (Dako, P0447) в течение 2 часов при 37°C при разведении 1:2000. После двух дополнительных стадий промывки добавляли 100 мкл TMB PLUS2 (Kem-En-Tec Diagnostics, 4395A) и инкубировали в течение 8 минут при комнатной температуре. Реакцию прекращали добавлением 100 мкл 0,2M H₂SO₄ и количественно оценивали путем измерения оптической плотности на 450 нм.

Детектирование Ad5-специфических антител в мышинной сыворотке проводили путем покрытия ELISA-планшетов термоинактивированным Ad5 (30 минут, 56°C) при плотности 5×10^9 вирусных частиц/мл. Анализ проводили как описано выше, но за более короткое время инкубирования для блокирования и связывания с антителом в течение 1 часа при комнатной температуре. Первое антитело представляет собой мышинное сывороточное антитело, серийно разведенное 1:2, начиная с 1:200.

Детектирование белков MelARV в клеточном лизате, супернатанте и в очищенных

VLP инфицированных клеток Vero осуществляли путем покрытия ELISA-планшетов соответствующими образцами. Клеточные лизаты разводили 1:2 в PBS (100 мкл), супернатант оставляли неразведенным (100 мкл), а очищенные VLP разводили 1:25 в PBS (50 мкл). Детектирование осуществляли с использованием анти-p2A антитела (1:500), MM2-9B6 (1:100), 4F5 (1:100) и 19F8 (1:100) в качестве первых антител и путем проведения процедуры, описанной выше для «вторых» антител как показано в Таблице 3.

Проточная цитометрия

В экспериментах с использованием HERV-K применяли FACS для детектирования внеклеточных и внутриклеточных маркеров активированных иммунных клеток вакцинированных мышей, а также для анализа на присутствие белка Env HERV-K на поверхности инфицированных клеток A549. Устройство, применяемое для клеточного сортирования, представляет собой проточный цитометр BD LSR II (BD Biosciences).

Для FACS были использованы следующие буферы:

Таблица 3с. Описание ингредиентов, содержащихся в различных буферах, используемых для FACS.

Буфер	Ингредиенты
Буфер для клеточного сортирования с активацией флуоресценции (FACS)	PBS 10 г/л альбумина бычьей сыворотки (BSA) 1 г/л NaN ₃
Промывочный буфер для FACS	PBS 1 г/л NaN ₃
Сбалансированный солевой раствор Хэнкса (BSS Хэнкса)	BSS Хэнкса (Corning, 55-022-PB) 185 мг/л CaCl ₂ *2H ₂ O 232 мг/л MgSO ₄ *7H ₂ O 10 мг/л фенолового красного
PBS	8 г/л NaCl 0,2 г/л KCl 1,15 г/л Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 0.2 г/л KH ₂ PO ₄ pH 7,4

Внеклеточное окрашивание сывороточными антителами

В экспериментах, не относящихся к HERV-K, проточную цитометрию проводили для детектирования связывания сывороточных антител с раковыми клетками. Клетки B16F10-GP или клетки CT26 ресуспендировали (как описано в разделе «заражение опухолью на день 0») и высевали при плотности 4×10^5 клеток на лунку в круглодонный

96-луночный планшет. Планшет центрифугировали при $784 \times g$ в течение 3 минут (4°C) для фиксации клеток на дне лунки. Среду удаляли путем опрокидывания планшета вверх дном, и клетки ресуспендировали в 50 мкл среды для клеточного сортирования с активацией флуоресценции (FACS) (PBS+1% BSA+0,1% NaN_3), содержащей мышиную сыворотку при разведении 1:50. После 20- минутного инкубирования при 4°C , планшеты центрифугировали при $784 \times g$ в течение 3 минут (4°C) и среду удаляли. Клетки два раза промывали 200 мкл промывочной среды (PBS+0,1% NaN_3) и ресуспендировали в 50 мкл среды для FACS, содержащей флуоресцентно меченное «второе» антитело против мышинового иммуноглобулина G (IgG) (козье антитело против мышинных IgG_APC; # 405308, BioLegend) при разведении 1:100. Клетки инкубировали в течение 20 минут при 4°C , два раза промывали промывочной средой и фиксировали в течение 15 минут при 4°C в 200 мкл раствора PFA (1% в PBS). Клетки два раза ресуспендировали в среде для FACS и анализировали на флуоресценцию в проточном цитометре BD LSR II.

Детектирование Env MelARV на поверхности инфицированных клеток Vero проводили в соответствии с тем же самым протоколом с использованием моноклональных антител против различных эпитопов (Таблица 5). Вторые антитела представляют собой антитело против мышинных IgG_APC (1:100) или козье антитело против мышинных тяжелых цепей IgM_RPE (1:100; A10689, Invitrogen).

Кроме того, этот метод был применен для характеристики новой стратегии вакцинации на основе Ad19-вектора, кодирующего трансгена HERV-K дикого типа и HERV-K с мутацией в ISD (Sirion), а также для сравнения со стратегией на основе других аденовирусных векторов (Ad19 по сравнению с Ad5). Поверхностное окрашивание проводили для детектирования присутствия белка Env HERV-K на поверхности инфицированных клеток A549 с помощью проточной цитометрии.

3×10^6 клеток A549 высевали в 75 см²-колбы в 15 мл среды Хэмса F-12K и инкубировали в течение 2 часов при 37°C . Каждую колбу инфицировали следующими вирусами при MOI 50 ($1,5 \times 10^8$ ИЕ/колбу):

Ad5 (TetO)-CMV-SIVgag_p2A_HERV-K108env_P2TS

Ad19a (II) - (TetO) -CMV-ISDmut_MelARV-P2TS

Ad19a (II) - (TetO) -CMV-coHERV-K-P2TS от Sirion

Ad19a (II) - (TetO) -CMV-ISDmut_coHERV-K-P2TS от Sirion

Затем их инкубировали 5 часов при 37°C , после чего среду заменяли средой Хэмса F-12K без FBS. После этого, клетки инкубировали в течение 48 часов при 37°C .

Клетки выдерживали на льду на лабораторном столике LAF. Затем среду отсасывали, и клетки тщательно промывали холодным PBS и соскабливали в этом холодном PBS перед отделением клеток путем центрифугирования (3 минуты, 4°C , $784 \times g$). Клетки ресуспендировали в PBS и распределяли по круглодонному 96-луночному планшету (Thermo Fisher Scientific, 163320). Планшет центрифугировали (3 минуты, 4°C , $784 \times g$), а супернатант удаляли путем переворачивания планшета. Клетки ресуспендировали в 50 мкл FACS-буфера, содержащего 2 мкг/мл мышинового

моноклонального «первого» антитела (IgG), направленного против домена p15E (TM) белка Env HERV-K (Austral Biologicals, HERM-1811-5), в течение 20 минут при 4°C. После этого, клетки промывали промывочным буфером для FACS (с использованием первого объема 150 мкл, а затем 200 мкл) и 3 раза центрифугировали (3 минуты, 4°C, 784× g). Планшеты инкубировали с 100 мкл FACS-буфера, в который ранее добавляли APC-конъюгированное «второе» козье антитело против мишиных IgG при разведении 1:100 (BioLegend, 405308). Эти планшеты оставляли на 20 минут при 4°C для инкубирования в защищенном от света месте. Клетки центрифугировали (3 минуты, 4°C, 784× g) и 3 раза промывали 200 мкл промывочного буфера для FACS. Затем их инкубировали в 200 мкл 1% (масс/об) параформальдегида (PFA; Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark) в течение 15 минут при 4°C в защищенном от света месте. После этого, их центрифугировали (3 минуты, 4°C, 784× g) и ресуспендировали в 100 мкл FACS-буфера, а затем снова центрифугировали (3 минуты, 4°C, 784× g). И наконец, эти планшеты ресуспендировали в 200 мкл и хранили в течение ночи при 4°C в темноте. На следующий день, флуоресценцию клеток анализировали на проточном цитометре BD LSR II, и данные обрабатывали и анализировали с использованием FlowJo 10 (FlowJo LLC).

Внутриклеточное окрашивание (ICS) стимулированных спленоцитов

Мышей умерщвляли через 3-4 недели после вакцинации и выделяли селезенку. Выделенную селезенку переносили в BSS Хэнкса и измельчали через стерильную сетку с получением моноклеточной суспензии. После центрифугирования и ресуспендирования в полной среде RPMI определяли концентрацию спленоцитов, и клетки разводили до требуемой концентрации.

Спленоциты добавляли в круглодонный 96-луночный планшет с $2,5 \times 10^6$ клеток/лунку. Клетки центрифугировали при 784× g в течение 3 минут и ресуспендировали в полной среде RPMI (+ 50 мкМ 2-меркаптоэтанола), содержащей 3 мкМ монензина (ингибитора пути) и 1 мкг/мл пептида (АН1), а в негативный контроль пептид не добавляли. Затем клетки инкубировали в течение 5 часов при 37°C. После промывки клеток в среде для FACS (PBS+1% BSA+0,1% NaN_3 +3 мкМ монензина), клетки инкубировали в течение 20 минут при 4°C с флуоресцентно мечеными поверхностными антителами (анти-CD4, анти-CD8, анти-CD44, анти-B220 антителами), разведенными 1:100 в среде для FACS. Клетки два раза промывали PBS+3 мкМ монензина и фиксировали в 1% PFA в течение 15 минут при 4°C. После промывки в среде для FACS, клетки делали проницаемыми с использованием 0,5% сапонина в PBS в течение 10 минут при комнатной температуре. Внутриклеточные антитела (анти-IFN γ , анти-TNF α антитела) добавляли при разведении 1:100 в PBS+0,5% сапонина и инкубировали в течение 20 минут при 4°C. Клетки два раза промывали, и наконец ресуспендировали в PBS+1% BSA+0,1% NaN_3 . Флуоресценцию клеток анализировали в проточном цитометре BD LSR II. Анализ данных проточной цитометрии представлен в Приложении к фигуре 5.

Таблица 5: Список «первых» антител, используемых для проточной цитометрии. В таблице перечислены «первые» антитела, используемые для проточной цитометрии, их

происхождение, рабочее разведение и соответствующее флуоресцентно-конъюгированное «второе» антитело. Некоторые «первые» антитела были непосредственно конъюгированы с флуоресцентным агентом и не должны быть помечены «вторым» антителом.

«Первое» антитело	Номер/происхождение продукта	Разведение	«Второе» антитело
Мышиная сыворотка	Выделенное у вакцинированной мыши	1:50	козье антитело против мышинных IgG_APC
19F8 (антитело против MeIARV Env; p15E)	Концентрированный супернатант клеточной культуры от гибридом (взятый у George Cianciolo, Duke University Medical Center)	1:50	козье антитело против мышинных IgG_APC
4F5 (антитело против MeIARV Env; p15E)	Концентрированный супернатант клеточной культуры от гибридом (взятый у George Cianciolo, Duke University Medical Center)	1:50	козье антитело против мышинных IgG_APC
MM2-9B6 (антитело против MeIARV Env; gp70)	20× супернатант клеточной культуры от гибридом (взятый у Tsuyoshi Takami, University of Arizona Health Sciences Center)	1:50	козье антитело против мышинных IgG_APC
MM2-3C6 (антитело против MeIARV Env; gp70)	20× супернатант клеточной культуры от гибридом (взятый у Tsuyoshi Takami, University of Arizona Health Sciences Center)	1:50	козье антитело против мышинных IgM_PE
MM2-9A3 (антитело против MeIARV Env; gp70)	супернатант клеточной культуры от гибридом (взятый у Tsuyoshi Takami, University of Arizona Health Sciences Center)	неразведено	козье антитело против мышинных IgG_APC

PerCP/Cy5.5-CD8	#100734, Biolegend	1:100	
FITC-CD4	#317407, Biolegend	1:100	
Pacific Blue-B220	#RM2628, Invitrogen	1:100	
APC/Cy7-CD44	#103028, Biolegend	1:100	
APC-IFN	#505810, Biolegend	1:100	
PE/Cy7-TNF α	#506324, Biolegend	1:100	
PE/Cy7-CD8	#100721, Biolegend	1:100	
Pacific Blue-CD8	#100728, Biolegend	1:100	
APC-CD8	#100711, Biolegend	1:100	
APC/Cy7-CD8	#100713, Biolegend	1:100	

В экспериментах с использованием HERV-K, внутриклеточное окрашивание (ICS) спленоцитов осуществляли для оценки специфических клеточных ответов у вакцинированных мышей. Для осуществления этого эксперимента, различные пептиды HERV-K, обладающие способностью к сильному связыванию (SB) и состоящие из 8-10 аминокислот у мышей C57BL/6 и у мышей BALB/c, были предварительно протестированы на их способность стимулировать CD8⁺-Т-клетки HERV-K-вакцинированных мышей. Только один 10-мерный пептид BALB/c (TYHNVSGMSL; SEQ ID NO: No.47) в положении 192 последовательности Env HERV-K давал ответ. Следовательно, этот пептид был обозначен Р-НКЕ и использован для стимуляции спленоцитов мышей BALB/c, иммунизированных векторами Ad5 и Ad19, кодирующими Env HERV-K, вместе с усовершенствованной вакциной Ad19, содержащей мутацию в ISD Env.

Таблица 5а. Антитела, используемые для внеклеточного и внутриклеточного окрашивания спленоцитов, полученных от вакцинированных мышей, для тестирования их клеточных ответов.

Антитело	Источник
PE/Cy7-конъюгированное моноклональное крысиное антитело против мышинового TNF α	BioLegend, 506324
APC-конъюгированное моноклональное крысиное антитело против мышинового интерферона γ (IFN γ)	BioLegend, 505810
Pacific Blue TM -конъюгированное моноклональное крысиное антитело против мышинового B220	Invitrogen, RM2628
APC/Cy7-конъюгированное моноклональное крысиное антитело против мышинового/человеческого CD44	BioLegend, 103028

PerCP/Cy5.5-конъюгированное моноклональное крысиное антитело против мышинового CD8a	BioLegend, 100734
FITC-конъюгированное моноклональное крысиное антитело против мышинового CD4	BioLegend, 100406
APC/Cy7-конъюгированное моноклональное крысиное антитело против мышинового CD8a	BioLegend, 100713
APC-конъюгированное моноклональное крысиное антитело против мышинового CD8a	BioLegend, 100711
Pacific Blue TM -конъюгированное моноклональное крысиное антитело против мышинового CD8a	BioLegend, 10072
PE/Cy7-конъюгированное моноклональное крысиное антитело против мышинового CD8a	BioLegend, 100721

Ad5 и Ad19 HERV-K/ISDmut-вакцинированные (примированные) мыши были использованы в этом эксперименте для сравнения эффективности различных вакцин, содержащих различные векторы, и стратегии с улучшенной вставкой. Мышей умерщвляли через 10 дней после бустер-иммунизации вектором MVA, и их селезенки собирали в 5 мл среды BSS Хэнкса. Селезенки измельчали через клеточные 70 мкм-фильтры со стерильной сеткой Corning® (Sigma-Aldrich, CLS431751) для получения моноклеточной суспензии. Затем, число клеток подсчитывали для посева нужного количества клеток/лунку, а также для получения общего числа клеток/селезенку для последующего вычисления абсолютного числа IFN γ ⁺-CD8⁺- и CD4⁺-Т-клеток на селезенку.

Приблизительно 3×10^6 клеток/лунку высевали в круглодонные 96-луночные планшеты, центрифугировали (3 минуты, 4°C, 784× g) и ресуспендировали в среде RPMI. 10-мерный пептид Env HERV-K, упоминаемый ранее как TYNMVSMSL (SEQ ID NO: 47) под названием Р-НКЕ, растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) до концентрации 400 нг/мкл. Затем смесь снова растворяли в PBS до концентрации 100 нг/мкл, и наконец, к полученному ранее разведению добавляли RPMI до концентрации 6,67 нг/мкл. Перед добавлением пептида Р-НКЕ, в целях предотвращения высвобождения цитокинов из клеток, в лунки добавляли 50 мкл ингибитора транспорта белка, монензина (3 мкМ). Кроме того, в стимулированные лунки добавляли 30 мкл/лунку вышеупомянутого пептида Р-НКЕ для индуцирования продуцирования Т-клеточных цитокинов. В остальные лунки не добавляли каких-либо пептидов, а добавляли только ДМСО в той же концентрации, как в стимулированных образцах, и эти лунки были использованы в качестве негативного контроля. Клетки инкубировали при 37°C в течение 5 часов.

После инкубирования, клетки центрифугировали (3 минуты, 4°C, 784 × g) и два раза промывали 100 мкл буфера для FACS, содержащего монензин (3 мкМ). Поверхностные антитела (PerCP/Cy5.5-CD8, FITC-CD4, Pacific Blue™-B220, APC/Cy7-CD44) разводили 1:100 в буфере для FACS, содержащем монензин (3 мкМ). Спленциты ресуспендировали в 50 мкл полученного ранее раствора и 50 мкл FACS/монензина (3 мкМ), содержащего разведенные 1:100 антитела: PerCP/Cy5.5-CD8, FITC-CD4, Pacific Blue™-CD8, APC/Cy7-CD8, APC-CD8, ПЭ/Сy7-CD8, используемые для компенсации. Планшеты инкубировали в течение 20 мин при 4°C в темноте. Лунки два раза промывали 100 мкл PBS с 3 мкМ монензина. Затем добавляли 100 мкл PBS/монензина (3 мкМ) вместе со 100 мкл PFA (2%) для фиксации клеток при 4°C в темноте. Клетки снова два раза промывали FACS/монензином (3 мкМ) и ресуспендировали в течение 10 минут при 20°C (в темноте) со 150 мкл 0,5% сапонины в PBS. После сообщения клеткам проницаемости, внутриклеточные антитела (APC-IFN γ , PE/Cy7-TNF α) разводили 1:100 в 0,5% сапонины/PBS, и в лунки добавляли 50 мкл, а затем планшеты инкубировали в течение 10 минут при 4°C в темноте. Клетки промывали PBS, содержащим 1% BSA и 0,1% NaN $_3$ и, наконец, ресуспендировали в 200 мкл того же самого буфера. Планшеты хранили в течение ночи при 4°C.

Кроме того, внутриклеточное окрашивание трансфицированных клеток A549 проводили для подтверждения присутствия белка Env HERV-K внутри клеток. В этом случае оценивали продуцирование (но не секрецию на клеточной мембране). Этот протокол включал дополнительную стадию 10-минутного инкубирования со 150 мкл 0,5% (масс/об) сапонины (Sigma Aldrich, 47036), разведенного в PBS при 4°C в темноте. Эта дополнительная стадия необходима для сообщения проницаемости клеточной мембране. Антитела также разводили в 0,5% сапонине.

Стратегия стробирования

FlowJo 10 (FlowJo LLC) использовали для анализа данных внеклеточного окрашивания и внутриклеточного (IC) FACS-окрашивания (см. фигуру 27). Сначала, клетки стимулировали для прямого рассеяния (FSC)-H и FSC-A и подвергали стробированию. Такое стробирование было применено для выделения популяции лимфоцитов в анализе на боковое рассеяние (SSC)-A и FSC-A. Последнюю популяцию стробировали на CD8 $^+$ -CD4 $^-$ -Т-клетки, а затем на CD8 $^+$ -B220 $^-$ -клетки с получением популяции CD8 $^+$ -Т-клеток и удалением CD4 $^+$ -Т-клеток и В-клеток (маркера B220) (Coffman & Weissman, 1981) из анализа. Затем клетки стробировали на CD8 $^+$ -CD44 $^+$ -Т-клетки с получением только активированных CD8 $^+$ -Т-клеток. Затем, эти клетки дополнительно стробировали на IFN γ $^+$ -CD4 $^+$ -Т-клетки, которые представляют собой маркеры, экспрессируемые после активации Т-клеток. Кроме того, известно, что IFN γ является более чувствительным маркером активации CD8 $^+$ -Т-клеток, чем цитокин TNF α (Badovinac & Harty 2000) (Kristensen et al., 2004). Кроме того, CD8 $^+$ -CD44 $^+$ -Т-клетки стробировали на IFN γ $^+$ -TNF α $^+$ -клетки, так как известно, что CD4 $^+$ -Т-клетки, которые продуцируют множество цитокинов, имеют более высокий уровень активности, быстро

активируются и превращаются в клетки памяти (Kannanganat et al. 2007).

Для оценки абсолютного числа $IFN\gamma^+$ - $CD44^+$ - $B220^-$ - $CD8^+$ -Т-клеток, % $IFN\gamma^+$ - $CD44^+$ - $B220^-$ - $CD8^+$ -Т-лимфоцитов умножали на число лимфоцитов в селезенке. Кроме того, % дважды позитивных ($IFN\gamma^+$ - $TNF\alpha^+$) $IFN\gamma^+$ - $CD8^+$ -клеток вычисляли путем деления числа $IFN\gamma^+$ - $TNF\alpha^+$ -клеток на сумму $IFN\gamma^+$ - $TNF\alpha^+$ -клеток и $IFN\gamma^+$ - $TNF\alpha^-$ -клеток.

Твердофазный иммунофокусирующий анализ (ELISPOT)

ELISPOT-анализы проводили для детектирования антиген-специфических Т-клеток. Пептидом, используемым в данном эксперименте, является АН1 (SPSYVYHQF), который представляет собой известный H2-Ld-рестриктированный Т-клеточный эпитоп у мышей Balb/C, который находится в субъединице gp70 Env MelARV (Huang, A.Y., et al., The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product. Proc Natl Acad Sci USA, 1996. **93**(18): p. 9730-5).

Спленоциты вакцинированных мышей были получены как описано для ICS.

Анализ проводили с использованием набора для ELISPOT мышинового $IFN\gamma$ в Т-клетках (CT317-PR5, U-CyTech). Вкратце, 96-луночный планшет с поливинилиденфторидной (ПВДФ) мембраной (MSIP S4510, Millipore) активировали 70% этанолом, а затем в течение ночи покрывали антителом против мышинового $IFN\gamma$. После удаления покрывающего антитела и блокирования мембраны, спленоциты высевали при плотности 2×10^5 клеток/лунку в полной культуральной среде RPMI, содержащей 1 мкг/мл АН1. В качестве контроля, спленоциты либо оставляли нестимулированными, либо стимулировали сильным Т-клеточным активатором конконовалином А (ConA) (2 мкг/мл). После инкубирования в течение 48 часов в нормальных условиях культивирования клеток, клетки удаляли, лунки промывали, а затем инкубировали с биотинилированным детектирующим антителом против $IFN\gamma$. После этого добавляли конъюгат стрептавидин-ПХ и пятна $IFN\gamma$ визуализировали с использованием раствора субстрата АЕС. Пятна подсчитывали на анализаторе CTL ImmunoSpot.

Позитивный контроль (контрольная сыворотка LEV76)

Позитивная контрольная сыворотка LEV76 была использована в качестве стандарта для анализа методом проточной цитометрии и анализа ELISA проб мышинной сыворотки. Сыворотка LEV76 была получена в более раннем экспериментальном исследовании, в котором мышей C57BL/6 вакцинировали против Env MelARV и наблюдали протективный эффект в отношении метастазов B16F10-GP в легких. Таким образом, гуморальный ответ для этой сыворотки соответствует уровню, который потенциально способен защитить от заражения опухолью, и он служил в качестве эталонной величины для успешного гуморального ответа. Кроме того, с использованием контрольной сыворотки LEV76 в качестве стандарта было проведено сравнение между различными экспериментами.

Статистические анализы

Все статистические анализы проводили с использованием компьютерной

программы GraphPad Prism (v5.03). Группы сравнивали с использованием двухсторонних непарных критериев Манна-Уитни. Значимость обозначена звездочками: * ($P \leq 0,05$); ** ($P \leq 0,01$); *** ($P \leq 0,001$). При сравнении различных групп вакцинированных мышей, результаты были представлены как среднее для каждой группы со стандартной ошибкой среднего (SEM).

Оценку Каплана-Мейера применяли для сравнения кривых выживаемости мышей. Этот критерий позволяет определять долю выживших индивидуумов в течение определенного периода времени после данной обработки. Значимые результаты показаны звездочками (*), * ($P \leq 0,05$); ** ($P \leq 0,01$); *** ($P \leq 0,001$).

Для оценки корреляции между ответами была применена корреляция Спирмана с последующей коррекцией р-величин методом Хольма-Сидака.

Пример 1

Мутация в иммуносупрессорном домене (ISD), кодируемом вакциной

В первой стратегии усовершенствования, две точковых мутации были введены в последовательность Env MelARV для инактивации иммуносупрессорного домена (ISD) (фиг. 3). Эти специфические мутации были протестированы и проанализированы ранее Schlecht-Louf et al. на вирус мышиноного лейкоза (Schlecht-Louf, G., et al., *Retroviral infection in vivo requires an immune escape virulence factor encrypted in the envelope protein of oncoretroviruses*. Proc Natl Acad Sci USA, 2010. **107**(8): p. 3782-7. Вирус, кодирующий этот модифицированный вариант Env MelARV, был обозначен Ad5-MelARV-ISD.

Влияние Ad5-MelARV-ISD на гуморальные ответы у мышей CD1

Аутбредных мышей CD1 примировали ДНК-MelARV или ДНК-MelARV-ISD, а затем вводили бустер-дозы Ad5-MelARV или Ad5-MelARV-ISD в соответствии со схемой вакцинации IV. Через четыре недели после вакцинации аденовирусом брали пробы крови и анализировали с помощью ELISA.

Как показано на фигуре 7А, количество р15Е-специфических антител у Ad5-MelARV-ISD-вакцинированных мышей было увеличено. В частности, комбинация ДНК-MelARV-ISD и Ad5-MelARV-ISD (гистограмма D) давала высокие гуморальные ответы, которые были сравнимы с ответами для контрольной сыворотки LEV76.

Кроме того, вакцинация Ad5-MelARV (гистограммы А и С) и Ad5-MelARV-ISD (гистограммы В и D) приводила к повышению уровня антител, специфичных к опухолевым клеткам (фигура 7В) по сравнению с GFP-контролем (гистограмма E). Однако, Ad5-MelARV-ISD индуцировал значимо более низкие уровни опухолевых связывающих антител, чем Ad5-MelARV (гистограммы А и В; также гистограммы С и D, но эти результаты не были значимыми).

Уровни р15Е- и В16F10-ГП-связывающих антител позволяют предположить, что примирование ДНК-MelARV-ISD, в основном, приводило к повышению гуморальных ответов по сравнению с ДНК-MelARV-примированными мышами, хотя эти результаты не были значимыми.

Пример 2

Влияние Ad5-MelARV-ISD на гуморальные ответы и метастазы у мышей C57BL/6

Мышей C57BL/6 вакцинировали и заражали по схеме вакцинации III. Мышам вводили либо ДНК-MelARV, либо ДНК-MelARV-ISD, а затем, соответствующий аденовирус. Анализ гуморальных ответов показал, что MelARV-ISD давал небольшое увеличение уровня антител, специфичных к клеткам B16F10-GP (фигура 8A). Однако, такое увеличение не было значимым и едва превышало фоновый уровень у PBS-вакцинированных мышей. Как показано на фигуре 8B, какого-либо влияния на антитела, специфичные к p15E, не наблюдалось. Что касается антител, связывающихся с опухолевыми клетками, то метастазы слегка снижались у MelARV-ISD-вакцинированных мышей, но без значимых различий (фигура 8C).

Пример 3

Влияние Ad5-MelARV-ISD на Т-клеточные ответы у мышей Balb/C

Помимо гуморальных ответов анализировали влияние Ad5-MelARV-ISD на примирование и активацию Т-клеток. ELISPOT (фигура 9) и ICS (фигура 10) показали повышенные уровни АН1-специфических Т-клеток у Ad5-MelARV-ISD-вакцинированных мышей по сравнению с Ad5-MelARV. Как показало ICS, число дважды позитивных $IFN\gamma^+$ - $TNF\alpha^+$ - $CD8^+$ -Т-клеток было значимо выше у Ad5-MelARV-ISD-вакцинированных мышей по сравнению с нативной формой. Кроме того, суммарное геометрическое среднее (IGM) $IFN\gamma^+$ -клеток указывало на значимое различие по сравнению с нативным Ad5-MelARV. IGM включает число позитивных клеток со средней интенсивностью флуоресценции и, таким образом, рассматривается как качественная величина активированных иммунных клеток. IGM $TNF\alpha$ все же не было значимым (данные не показаны).

Пример 4

Влияние Ad5-MelARV/Ad5-MelARV-ISD на иммуносупрессию

Для анализа механизмов, лежащих в основе повышения иммунных ответов Ad5-MelARV-ISD, была проанализирована иммуносупрессия под действием вакцины. Сыворотку тех же самых мышей, показанных на фигуре 7, а именно, Ad5-MelARV- или Ad5-MelARV-ISD-вакцинированных мышей анализировали на иммунные ответы против вирусного вектора Ad5 с помощью ELISA. ISD-инактивированная вакцина на основе Env MelARV (Ad5-MelARV-ISD) давала значимое увеличение титра Ad5-связывающих антител по сравнению с нативным вариантом Env MelARV (Ad5-MelARV с функциональным ISD).

Пример 5

Презентация антигенов на капсидном белке pIX аденовирусного вектора

В целях повышения уровня протективных гуморальных ответов, p15E связывали с аденовирусным капсидным белком pIX на ранее протестированных аденовирусных вакцинах. Различные протестированные конструкции представлены на фигуре 12. Любой из нативных p15E (за исключением трансмембранной субъединицы и цитоплазматического хвоста) добавляли к pIX (1), или альтернативно, к ISD-

мутированному варианту (2). Кроме того, варианты p15E, усеченные до ISD, тестировали на презентацию дополнительного цистеина (3), либо на ее отсутствие (4). Сердцевина вирусного вектора соответствовала презентированному p15E: Ad5-MelARV для pIX-p15E, pIX-p15E-trunc-wC и pIX-p15E-trunc-w/oC и Ad5-MelARV-ISD для pIX-p15E-ISD.

Характеризация векторов Ad5, презентующих p15E на капсидном белке pIX

Новые плазмидные конструкции pIX (pcDNA3-pIX-Taglinker-xxx, где xxx=антиген p15E) тестировали на правильную экспрессию рекомбинантного pIX путем трансфекции клеток HEK293. Лизаты трансфицированных клеток анализировали с помощью Вестерн-блот-анализа с использованием анти-pIX антитела, фигура 13А. Все четыре конструкции обнаруживали экспрессию рекомбинантного pIX с ожидаемыми нижними полосами для усеченных вариантов p15E (дорожки 3 и 4). GFP, связанный с pIX, был использован в качестве позитивного контроля с выше расположенной полосой приблизительно 50 кДа. Для подтверждения интеграции рекомбинантного pIX в вирусный вектор, очищенные вирусы анализировали с помощью Вестерн-блот-анализа с использованием анти-pIX антитела, фигура 13В. Помимо нативной полосы pIX (приблизительно 10 кДа), все конструкции обнаруживали экспрессию рекомбинантного pIX. Негативный контроль, а именно, немодифицированный Ad5 (Ø) обнаруживал только нативную полосу pIX. Интенсивности полос были количественно определены с использованием программы ImageJ (версия 1.51n), и были показаны проценты рекомбинантного pIX. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**

Таблица 8: Эффективность интеграции рекомбинантного pIX в вектор Ad5. Рекомбинантные вирусы Ad5, презентующие белок на вирусном pIX, анализировали на эффективность интеграции рекомбинантного pIX в вирусный вектор. Вирусы анализировали с помощью Вестерн-блот-анализа (фигура 13) и количественно оценивали интенсивности полос. В Таблице показаны проценты рекомбинантного pIX от общего числа pIX в вирусной частице.

Вирус	% рекомбинантного pIX от всех pIX
Ø	0%
Ad5-MelARV_pIX-p15E	32%
Ad5-MelARV-ISD_pIX-p15E-ISD	29%
Ad5-MelARV_pIX-p15E-trunc-wC	35%
Ad5-MelARV_pIX-p15E-trunc-w/oC	35%

Пример 6

Анализ гуморальных ответов, индуцированных pIX-модифицированными вирусами у мышей CD1

Мышей CD1 вакцинировали по схеме вакцинации IV путем введения первичной дозы ДНК (ДНК-MelARV или ДНК-MelARV-ISD) с последующим введением бустер-дозы аденовируса (обычного вируса по сравнению с pIX-модификациями). Сыворотку крови анализировали с помощью ELISA на p15E-специфические антитела, фигура 14А.

Поскольку последовательность пептида p15E, используемого для ELISA, не была включена в усеченные варианты модификации pIX, то в этом эксперименте оценивали только Ad5-MelARV_pIX-p15E и Ad5-MelARV-ISD_pIX-p15E-ISD. В большинстве случаев презентации p15E на pIX наблюдалось повышение уровня p15E-специфических антител (А по сравнению с В; С по сравнению с D, Е по сравнению с F). Однако, в этих сравнениях, значимое различие наблюдалось только для ДНК-MelARV+Ad5-MelARV (А по сравнению с В). В случае ДНК-MelARV-ISD+Ad5-MelARV-ISD (G по сравнению с H), презентация pIX-p15E-ISD давала негативный эффект и значительно снижала уровни гуморальных ответов по сравнению с немодифицированной вакциной. Кроме того, анализировали связывание сывороточных антител с клетками B16F10-GP (фигура 14B). Презентация нативного p15E на pIX не оказывала негативного влияния на гуморальные ответы против опухолевых клеток. С другой стороны, Ad5-MelARV-ISD_pIX-p15E-ISD была способна компенсировать недостаток B16F10-GP-специфических антител, вызванный ISD-мутированным Env MelARV (см. фигуру 7).

Пример 7

Влияние Ad5-MelARV_pIX-p15E на гуморальные ответы и метастазы у мышей C57BL/6

pIX-модифицированный вирус Ad5-MelARV_pIX-p15E тестировали в экспериментальном исследовании на гуморальные ответы и на защиту от метастазов у мышей C57BL/6. Мышей вакцинировали два раза и заражали по схеме вакцинации V. Как показано на фигурах 15A и 15B, ни одна из вакцин не давала значимого увеличения гуморальных ответов на клетки B16F10-GP (15A) или p15E (фигура 15B). Кроме того, после вакцинации, число метастазов значимо не снижалось (фигура 15C). Однако, несмотря на отсутствие детектируемой корреляции между антителами, специфичными к опухолевым клеткам, и числом метастазов (фигура 15D), значимая негативная корреляция наблюдалась между уровнем p15E-специфических антител и числом метастазов (фигура 15E).

Пример 8

Для улучшения презентации Env MelARV на VLP в отношении не только количества, но также и качества (в более естественной конформации), функциональные домены встраивали в нативную последовательность. Эти модификации были применены к полноразмерному Env MelARV, а также в одному p15E (фигура 16). Модификации включали сигнальный пептид люциферазы Gaussia (LucSP), трансмембранный домен и цитоплазматический хвост гемагглютинина H3N2 вируса гриппа А (HA-TMCT) и последовательность тримеризации (GCN4) (фигура 16). Химерные белки Env или p15E кодировались совместно с белком Gag SIV.

Характеризация вакцин, кодирующих химерные Env MelARV или p15E

Модифицированные вакцины не были протестированы на мышах до тех пор, пока не была протестирована экспрессия аденовирусов с помощью проточной цитометрии в инфицированных клетках Vero (фигура 17). Этот эксперимент показал не только

экспрессию белков, но также позволил охарактеризовать некоторые антитела против Env MelARV в отношении их эпитопа-мишени. Оба 19F8 (фигура 17A) и 4F5 (фигура 17B) показали существенное увеличение уровня связывания с модифицированными вариантами Env MelARV и p15E по сравнению с нативными вакцинами (Ad5-MelARV и Ad5-MelARV-ISD). Поскольку могло наблюдаться также связывание с Ad5-LucSP_GCN4_p15E_На-ТМСТ, то этот эксперимент показал, что оба антитела связываются с трансмембранной субъединицей p15E. Кроме того, какого-либо связывания 19F8 с Ad5-MelARV-ISD-инфицированными клетками не наблюдалось, тогда как четкий сигнал обнаруживался для 4F5, что подтверждает, что ISD служит в качестве эпитопа-мишени 19F8. Ни одно из антител MM2 не связывалось с конструкцией p15E, что указывает на то, что все три антитела направлены против поверхностной субъединицы gp70. MM2-9B6 (фигура 17C) и MM2-3C6 (фигура 17D) показали сходные профили с одинаково сильным связыванием антител с Ad5-MelARV- и Ad5-LucSP_MelARV_На-ТМСТ-инфицированными клетками. С другой стороны, Ad5-MelARV-ISD-инфицированные клетки показали гораздо меньшее связывание с антителом. Профиль MM2-9A3 (фигура 17E) был аналогичным, за исключением того, что Ad5-MelARV-инфицированные клетки связывались с антителом в меньшей степени, чем Ad5-LucSP_MelARV_На-ТМСТ-инфицированные клетки.

Новые конструкции были также протестированы на их способность продуцировать и презентировать белок-мишень после инфицирования. Лизаты инфицированных клеток Vero и очищенных VLP анализировали с помощью Вестерн-блот-анализа (фигура 18). Связывание с анти-P2A антителом (фигура 18A) показало, что полосы Gag MelARV (дорожки 1 и 2) и Gag SIV (дорожки 3 и 4) экспрессировались в лизате и в VLP. Как показано на фигуре 18B, p15E (связанный с 4F5) был обнаружен только в лизатах Ad5-MelARV-инфицированных клеток (дорожка 1) с небольшой полосой размером приблизительно 20 кДа, соответствующей p15E, и более крупной полосой 70 кДа, соответствующей полноразмерному Env (gp70+p15E). Полноразмерный Env детектировался также для Ad5-MelARV-ISD (дорожка 2), тогда как ни одной полосы p15E не наблюдалось. И только в Ad5-MelARV-индуцированных VLP детектировались p15E и полноразмерный Env. Другие слабые полосы наблюдались для различных конструкций, но было не ясно, каким белкам они соответствуют.

Результат, аналогичный результату для 4F5, показан на фигуре 18C, где gp70 был визуализирован под действием MM2-9B6. И только Ad5-MelARV-индуцированные VLP (дорожка 1) презентировали MM2-9B6-детектируемый gp70.

Помимо клеточных лизатов, супернатанты инфицированных клеток анализировали для того, чтобы определить, являются ли белки секретируемыми (фигура 18D, E). p15E (связанный с 4F5) в супернатанте (фигура 18D) детектировался только для Ad5-MelARV (дорожка 1), что может быть вызвано присутствием VLP в супернатанте. С другой стороны, MM2-9B6 (фигура E), показал, что Ad5-MelARV-ISD-инфицированные клетки (дорожка 2) высвобождали большое количество gp70, которые детектировались как

конъюгаты различных размеров (фигура 18E). В противоположность этому, Ad5-MelARV индуцировал высвобождение незначительного количества gp70 (дорожка 1).

Ни один из новых модифицированных белков Env MelARV (дорожки 3 и 4) не обнаруживал экспрессию белка в лизате, в супернатанте или в очищенных VLP, несмотря на их детектируемую экспрессию на клеточной поверхности в неденатурирующих условиях.

Из-за отсутствия полос для новых конструкций в Вестерн-блот-анализах было высказано предположение, что синтезированный белок не способен связываться с нитроцеллюлозной мембраной. Таким образом, ELISA-анализ проводили с использованием ELISA-планшета, покрытого клеточным лизатом, супернатантом или VLP (фигура 19). Как и ожидалось, белок Gag, детектируемый анти-p2A антителом, присутствовал во всех образцах (фигура 19A). В противоположность этому, gp70 Env MelARV (связанный с MM2-9B6) детектировался только в VLP Ad5-MelARV-инфицированных клеток (дорожка 1), но не в клетках, инфицированных модифицированными вирусами MelARV (фигура 19B). Аналогичный результат наблюдался для экспрессии p15E (связанного с 4F5 и 19F8) (фигура 19C, D). Ad5-MelARV (дорожка 1) индуцировал высокий уровень экспрессии трансмембранной субъединицы, которая успешно интегрировалась в VLP. С другой стороны, для Ad5-MelARV-ISD (дорожка 2), почти ни в одном из образцов белок не детектировался. Модифицированные вакцины (дорожки 3 и 4) индуцировали экспрессию и интеграцию VLP p15E до определенной степени, но на гораздо более низком уровне, чем нативная вакцина на основе Env MelARV (фигура 19C, D).

Пример 9 (Сравнение)

Для иммунизации мышей Balb/C использовали следующие конструкции: gag-P2A-ConB-gp140-G/CD ВИЧ В (дикого типа), gag-P2A-ConB-gp140-G/CD-ISD#4 ВИЧ В (Y75G), gag-P2A-ConB-gp140-G/CD-ISD#19 ВИЧ В (L70Q), gag-P2A-ConB-gp140-G/CD-G19Rdb ВИЧ В (G83K, S88F). Гуморальные ответы анализировали через 4 недели (день 28 - фигура 20A) и 7 недель (день 49 - фигура 20B) после иммунизации против белка ConB-gp140 ВИЧ дикого типа. Отдельная группа мышей, иммунизированных IiGP-P2A-IFNalpha4 и gag-P2A-ConB-gp140-G/CD ВИЧ В (дикого типа) (420B), служила в качестве контрольной группы для оценки ответов, индуцированных интерфероном типа I.

Для иммунизации мышей с нокаутом c57/b16 или IFN γ c57/b16 использовали следующие конструкции: аденовирус, кодирующий gag-p2A ВИЧ кладотипа В, за которым следует последовательность gp140 консенсусной последовательности кладотипа В (gag-P2A-ConB-gp140-G/CD ВИЧ В (дикого типа) и gag-P2A-ConB-gp140-G/CD-ISD#19 ВИЧ В (L70Q)). Гуморальные ответы определяли через 4 недели после иммунизации (день 26 - фигура 20C) против белка ConB gp140 CF ВИЧ.

Пример 10

Для иммунизации мышей Balb/C использовали следующие конструкции: gag-P2A-ConB-gp140-G/CD ВИЧ В (дикого типа), gag-P2A-ConB-gp140-G/CD-ISD#4 ВИЧ В

(Y75G), gag-P2A-ConB-gp140-G/CD-ISD#19 ВИЧ В (L70Q), gag-P2A-ConB-gp140-G/CD-G19Rdb ВИЧ В (G83K, S88F). Через четыре месяца после иммунизации (день 114), мышей анализировали на Т-клеточные ответы против пулов пептидов, охватывающих ген Gag (МА (P17, матрица) (пептиды 1-31), СА (p24, капсид) (пептиды 32-89), один пул, охватывающий p2, NC (нуклеокапсид), p1 и p6 (пептиды 90-124), gp120 (1) (пептиды 1-62), gp 120 (2)(пептиды 63-124), gp41 (пептиды 125-211).

Пример 11

Мышей BALB/С вакцинировали MVA, экспрессирующим gag, env, gag+env, gag+envISDmut в виде VE-VLP, или аденовирусом, экспрессирующим gag-env, или gag+envISDmut в виде VE-VLP, и их комбинациями, и пептидные ответы оценивали в отношении предсказанных МНС, связывающихся с пептидами длиной в 9 аминокислот, с помощью ELISPOT-анализа или внутриклеточного окрашивания цитокинов.

Gag-env или gag+envISDmut VEVLP, в частности, в аденовирусных векторах, с высокой степенью вероятности превосходят ранее описанные векторы MVA в отношении индуцирования Т-клеточных ответов.

Пример 12

Мышей BALB/С вакцинировали MVA, экспрессирующим gag, env, gag+env, gag+envISDmut в виде VE-VLP, или аденовирусом, экспрессирующим gag-env, или gag+envISDmut в виде VE-VLP, и их комбинациями, и пептидные ответы оценивали в отношении пептидов, происходящих от последовательности внеклеточной части трансмембранного домена p15E HERV-Kcon.

Векторы Gag-env или gag+envISDmut VEVLP, как и ожидалось, превосходят ранее описанные векторы MVA в отношении индуцирования Т-клеточных ответов.

Пример 13

Животных подкожно заражали клетками почечной карциномы RENCA, экспрессирующими HERVcon-gag и HERVcon-env, соответственно. Затем животных вакцинировали MVA, экспрессирующим gag, env, gag+env, gag+envISDmut в виде VE-VLP, или аденовирусом, экспрессирующим gag-env или gag+envISDmut в виде VE-VLP, и их комбинациями, а затем проводили мониторинг роста опухоли.

Удаление опухоли, как и ожидалось, было более эффективным с использованием вакцин VE-VLP, и вакцины VEVLP gag-env обладали уникальной способностью регулировать рост опухоли обеих клеточных линий.

Пример 14

Животных подкожно заражали клетками почечной карциномы RENCA, экспрессирующими HERVcon-gag и HERVcon-env, соответственно. Затем животных вакцинировали MVA, экспрессирующим gag, env, gag+env, gag+envISDmut в виде VE-VLP, или аденовирусом, экспрессирующим gag-env или gag+envISDmut в виде VE-VLP, и их комбинациями, а затем проводили мониторинг роста опухоли путем вивисекции, и число метастазов подсчитывали через 30 дней после заражения опухолью.

Удаление опухоли, как и ожидалось, было более эффективным с использованием

вакцин VE-VLP, и вакцины VEVLP gag-env обладали уникальной способностью регулировать рост опухоли обеих клеточных линий.

Пример 15

При реализации стратегии иммунотерапии, описанной в предыдущих примерах, был сконструирован релевантный вариант человеческой вакцины с использованием аденовирусного вектора (Ad5/Ad19a), кодирующего консенсусный оболочечный белок (Env) человеческого эндогенного ретровирус типа К (HERV-K) и белки группоспецифических антигенов (Gag) ([Dewannieux et al., 2006](#)), что позволило получить VLP в трансдуцированных клетках ([Muster et al., 2003](#)). Для усовершенствования стратегии вакцинации, ISD, содержащийся в субъединице p15E белка Env HERV-K ([Morozov et al., 2013 г.](#)), был инактивирован путем введения одной точковой мутации (см. фигуру 22), выбор которой был сделан как описано в работе [Morozov et al., 2012](#), и на основе консервативности между HERV-K и ВИЧ ([van der Kuyl 2012](#)) ([Dewannieux et al., 2005](#)).

HERV-K Gag-P2A-EnvISDmut имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID No. 48):

```

MGQTKSKIKSKYASYLSFIKILLKRGGVKVVSTKNLIKLFQIIEQFCPWFPEQGTLDL
KDW
KRIGKELKQAGRKGNIPLTVWNDWAIKAALEPFQTEEDSVSVSDAPGSCIIDCN
ENTR
KKSQKETEGHLHCEYVAEPVMAQSTQNVQDYNQLQEVYYPETLKLEGKGPPELVGPS
ESKPRG
TSPLPAGQVPVTLQPQKQVKENKTQPPVAYQYWPPAELQYRPPPEQYGYPGMP
PAPQGR
APYPQPPTRRNLNPTAPPSRQGSSELHEIIDKSRKEGDTEAWQFPVTLEPMPPGEGAQ
EGEP
PTVEARYKSFSIKMLKDMKEGVKQYGPNSPYMRTLLDSIAHGHRLIPYDWEILA
KSSLSP
SQFLQFKTWWIDGVQEQRNRANPPVNIDADQLLGIGQNWSTISQQALMQN
EAIEQVR
AICLRAWEKIQDPGSTCPSFNTVRQGSKEPYPDFVARLQDVAQKSIADKARKVI
VELMA
YENANPECQSAIKPLKGVKVPAGSDVISEYVKACDGIGGAMHKAMLMAQAITGV
VLGGQVR
TFGGKCYNCGQIGHLKKNCPLVNLKQNITIQATTTGREPPDLCPRCKKGKHWASQ
CRSKFD
KNGQPLSGNEQRGQPAPQQTGAFFIQPFVPPQGFQGGQPPLSQVFQGISQLPQYN
NCPPP
QAAVQQGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMNPSEMQRKAPPRRRRHRNRAPLTH
KMNMVMT

```

SEEQMKLPSTKKAEPPTWAQLKKLTQLATKYLENTKVTQTPESMLLAALMIVSM
 VVSLPM
 PAGAAAANYTYWAYVVPFPLIRAVTWMDNPIEVYVNDVWVPGPIDDRCPAKP
 EEGMMI
 NISIGYRYPPICLGRAPGCLMPAVQNWLVVEVPTVSPISRFTYHMOVSGMSLRPRVN
 YLQDF
 SYQRSCLKFRPKGKPCPKKEIPKESKNTEVLVWEECVANSAVILQNNFEGTIIDWAP
 RGQFY
 HNCSGQTQSCPSAQVSPAVIDSLTESLDKHKHKKLQSFYPWEWGEKGISTPRPKI
 VSPVS
 GPEHPELWRLTVASHHIRIWSGNQTLERDRKPFYTVDLNSSLTVPLQSCVKPPY
 MLVVG
 NIVIKPDSQTITCENCRLTLCIDSTFNWQHRILLVRAREGVWIPVSMGRPWEASPS
 VHIL
 TEVLKGVNRSKRIFITLIAVIMGLIAVTATAAVAGVALHSSVQSVNFVNDWQK
 NSTRLW
NSQSSIDQKLANAINDLRQTVIWMGDRLMSLEHRFQLQCDWNTSDFCITPQIYNE
 SEHFW
 DMVRRHLQGREDNLTLDISKLKEQIFEASKAHLNLVPGTEAIAGVADGLANLNP
 VTWVKT
 IGSTTIINLILVCLFCLLLVCRCTQQLRRSDHRRERAMMTMAVLSKRKGGNVG
 KSKRD
 QIVTVSV*

Эти вакцины были протестированы на иммуногенность у мышей BALB/c, C57BL/6 и CD1, и этих мышей заражали мышинными клетками почечной карциномы (Rensa или RLZ), экспрессирующих белок-мишень Env HERV-K у мышей BALB/C, для оценки их эффективности, как было определено по кривым выживаемости мышей. Эти иммунные ответы оценивали на способность индуцировать клеточные и гуморальные ответы, тестировали на присутствие $IFN\gamma^+$ - $CD8^+$ -Т-клеток (с помощью FACS-анализа), а также на специфические антитела (детектируемые с помощью ELISA) против белка-мишени Env HERV-K у мышей, иммунизированных вакцинами ДНК/Adv-HERV-K дикого типа/ISD и путем введения бустер-дозы Env MVA.

Вакцину Ad19-HERV-K дикого типа и ее усовершенствованный вариант, содержащий мутацию ISD, тестировали и сравнивали на их способность индуцировать экспрессию VLP, образующихся под действием Gag_p2A_Env HERV-K Adv-кодируемых белков. Уже существовавший иммунитет у человека, который приводит к продуцированию нейтрализующих антител (NAbs), блокирующих иммунный ответ, может рассматриваться как недостаток использования векторов Ad5. Кроме того, известно, что векторы Ad19 являются более эффективными для трансдукции клеток различных видов (Kiener et al., 2018). Следовательно, была также проанализирована ценность различных

аденовирусных векторов (Ad19 по сравнению с Ad5) и было проведено их сравнение.

Для анализа функциональности новой стратегии, вакцины были проанализированы на индуцирование белков-мишеней Gag и Env HERV-K. Таким образом, продуцирование и секрецию VLP тестировали в клеточных линиях VERO и A549, трансфицированных различными вирусными вакцинами, содержащими различные представляющие интерес последовательности (см. фигуру 23). Супернатанты (SN) и клеточные лизаты вышеупомянутых трансфицированных клеточных линий были протестированы на присутствие белков Gag и Env HERV-K с помощью Вестерн-блот-анализа (WB). HERM-1811-5 и HERM-1821-5, моноклональные антитела против p15E (TM) и gp70 (SU) были специально использованы для детектирования доменов Env HERV-K, тогда как поликлональное кроличье анти-p2A антитело было использовано для детектирования белка Gag, связанного с p2A. Для детектирования были использованы ПХ-конъюгированные «вторые» антитела.

Результаты WB показали наличие белка Gag_{p2A} HERV-K, а также белка Env HERV-K в SN и в клеточных лизатах Ad19_{HERV-K} WT/ISDmut-трансфицированных клеток VERO и A549. Более высокий уровень экспрессии белков Gag и Env, происходящих от Ad19_{HERV-K}-ISDmut-трансфицированных клеток (как показано в рядах 2 и 8 на фигуре 23) позволяет предположить о повышении функциональности и увеличения потенциала модифицированной вакцины-прототипа по сравнению с вакцинами Ad19_{HERV-K}_WT и Ad5_{HERV-K}_Env. Кроме того, отсутствие белков Gag и Env в SN Ad19_{HERV-K}-трансфицированных клеток VERO можно объяснить низкой концентрацией белка, полученного после очистки VLP из соответствующего образца.

Для дополнительного подтверждения экспрессии белка-мишени Env HERV-K, клетки A549 трансфицировали VLP-кодируемыми аденовирусными вакцинами (см. фигуру 24). Через 48 часов после инфицирования, клетки инкубировали с «первыми» антителами против Env HERV-K (HERM-1811), а затем метили «вторым» козым APC-конъюгированным антителом против мышиных IgG с предварительной фиксацией и сообщением проницаемости и без них. Внутриклеточную и внеклеточную флуоресценцию связанных антител и, следовательно, экспрессию Env HERV-K внутри и за пределами инфицированных клеток анализировали с помощью FACS. Полученные результаты свидетельствуют о повышении эффективности трансфекции при использовании вектора Ad19 по сравнению с Ad5, поскольку, хотя они и кодируются одним и тем же белком-мишенью, однако, более сильный сигнал детектировался при использовании Ad19. При сравнении вакцин Ad19_{HERV-K} WT и ISDmut, больший сигнал клеточной поверхности и аналогичный внутриклеточный сигнал детектировались в Ad19_{HERV-K}_ISDmut-трансфицированных клетках, что указывало на улучшение сортировки мутированной последовательности на клеточной поверхности.

Для визуального подтверждения продуцирования структурного белка Gag и последующего высвобождения Env HERV-K, клетки A549 инфицировали Ad19_{HERV-K}_ISDmut при MOI 50 и фиксировали через 24 часа и 48 часов после инфицирования.

Почкование и секреция VLP были затем детектированы под электронным микроскопом (см. фигуру 29), что указывает на то, что вакцины были полностью способны экспрессировать белок-мишень Gag и Env HERV-K, который был включен в секретируемые VLP.

Пример 16

Для тестирования Т-клеточного ответа, индуцированного вакцинами Ad19_HERV-K WT/ISDmut, анализировали Т-лимфоцитарный ответ против Р-НКЕ (10-мерного пептида Env HERV-K с последовательностью TYNMVSGMSL) у мышей BALB/c. Поскольку Р-НКЕ представляет собой эпитоп, рестриктированный МНС класса I, то активация CD8⁺-Т-клеток и таким образом секреция цитокинов интерферона-гамма (IFN γ) и фактора некроза опухоли альфа (TNF α) после пептидной стимуляции мышей BALB/c были измерены путем внутриклеточного окрашивания (ICS) цитокинов с использованием FACS.

Мышей BALB/C примировали различными вакцинами, состоящими из различных векторов (Ad5/Ad19/MVA), кодирующих белки HERV-K. После этого, половине из них вводили бустер-дозу Env MVA для того, чтобы определить, может ли наблюдаться повышение клеточного ответа после проведения первой схемы иммунизации. Мышей умерщвляли через 10 дней после введения бустер-дозы MVA, и их спленоциты анализировали с помощью FACS после Р-НКЕ-стимуляции (см. фигуру 25). У групп, получавших вакцины Ad19_HERV-K_WT/ISDmut, наблюдалось более высокое число специфических CD8⁺-Т-клеток, секретирующих IFN γ , после введения бустер-дозы (MVA-ENV) и в отсутствие такого введения (Ø). Кроме того, клеточные ответы, индуцированные введением всех adv-вакцин, вероятно, увеличивались после введения бустер-дозы MVA. Очевидно, что такая бустер-доза указывает на различия между используемыми вакцинами, особенно при определении отношения IFN γ /TNF α -CD8⁺-Т-клеток, причем, значимый процент увеличения наблюдался у группы мышей, которым вводили усовершенствованную ADV-вакцину (Ad19_HERV-K_ISDmut). Это позволяет предположить, что вектор Ad19, кодирующий представляющую интерес последовательность, был наиболее подходящим для индуцирования релевантных CD8⁺-Т-клеточных ответов в соответствии со схемой «прайм-буст» по сравнению с векторами Ad5 и MVA. Кроме того, эти результаты позволяют предположить, что вектор MVA может быть использован в схемах бустер-вакцинации для повышения уровня цитотоксического Т-клеточного ответа против белка-мишени Env HERV-K. Эти результаты вместе указывали на особенно эффективную схему вакцинации, которая вырабатывала специфические IFN γ ⁺-CD8⁺-Т-клеточные ответы против опухолевых клеток, экспрессирующих Env HERV-K, и такая схема вакцинации состоит из иммунизации вектором Ad19, предпочтительно, кодирующим белки HERV-K_Gag_p2A_Env-ISDmut, а также введения бустер-дозы вектора MVA, кодирующего белок HERV-K_Env.

Пример 17

Для тестирования и сравнения эффективности вакцин, мышей заражали, а затем

вакцинировали, после чего оценивали их выживаемость, которая коррелировала с прогрессированием опухоли (см. фигуру 26). Для этого эксперимента, мышей BALB/C внутривенно заражали клетками RENCA, экспрессирующими Env HERV-K. Через 10 дней после заражения опухолью, мышей вакцинировали Env MVA, Ad19 HERV-K WT/ISDmut и нерелевантной вакциной в качестве контроля.

Этот эксперимент был проведен как описано в литературе (Kraus et al., 2013 PLoS One Aug 30; 8(8):e72756) в целях оценки метастатической опухолевой нагрузки через 40 дней после инъекции, но в данном случае, животных взвешивали и измеряли длину тела животных, и если у животных наблюдались какие-либо физические, поведенческие или физиологические изменения, или если потеря их массы составляла более, чем 10%, мышей умерщвляли. После умерщвления мышей, их легкие собирали и хранили в 4% PFA для последующего анализа на наличие метастазов. Примечательно то, что все животные, умерщвленные из-за потери массы, имели значительную опухолевую нагрузку. Неожиданно было обнаружено, что высокая смертность была зарегистрирована во время проведения эксперимента, после чего были построены кривые выживаемости, которые сравнивали с кривыми для различных групп. Полученный результат указывал на более быстрое прогрессирование опухоли RENCA-HERV-K по сравнению с ранее зарегистрированным результатом. В соответствии с этой довольно жесткой моделью заражения опухолью, предполагаемая продолжительность жизни мышей, получавших вакцину Ad19_HERV-K_ISDmut, значимо увеличивалась по сравнению с контролем. Три различных статистических критерия (логранговый критерий, критерий Уилкоксона и критерий Тарона-Уэя) давали значимые р-величины (0,037, 0,046 и 0,040). Это позволяет предположить, что вакцина Ad19_HERV-K_ISDmut приводила к замедлению прогрессирования опухоли легких и метастазов у мышей BALB/c, что соответствовало вышеупомянутым результатам, указывающим на увеличение уровней антител и CD8⁺-Т-клеточных ответов. Ни одна из других вакцин не приводила к увеличению продолжительности жизни.

Пример 18

Для дополнительного подтверждения результатов, полученных у человека, из опухоли человеческой молочной железы брали образцы ткани. Эти образцы разрезали на кубики по 4 мкм и окрашивали 1:1000-разведенными «первыми» антителами, полученными у неиммунизованных мышей (перед забором сыворотки крови), и у Ad5_HERV-K_Env-примированных мышей, которым вводили бустер-дозу по схеме вакцинации Ad19_HERV-K_ISD (через 8 недель) и MVA_Env (через 2 месяца). Как показано на рисунке 28, анти-HERV-K антитела, взятые у вакцинированных мышей, обладали способностью окрашивать раковую ткань, экспрессирующую белок-мишень HERV-K.

Различные аспекты и их реализации были описаны на различных вариантах осуществления изобретения. Однако, в эти раскрытые варианты изобретения могут быть внесены другие изменения, которые являются очевидными и подходящими для раскрытия

заявленного предмета изобретения, исходя из графического материала, раскрытия изобретения и прилагаемой формулы изобретения. В формуле изобретения, слово «содержащий» не исключает другие элементы или стадии, а неопределенный артикль «а» или «an» не исключает их использования во множественном числе. Один процессор или другой элемент могут выполнять функции нескольких элементов, указанных в формуле изобретения. Тот факт, что некоторые величины представлены во взаимоисключающих зависимых пунктах формулы изобретения, не означает, что комбинация этих измеренных значений не может быть использована для достижения определенного преимущества. Компьютерная программа может храниться на подходящем носителе/перенесена на подходящий носитель, такой как оптический носитель данных или полупроводниковый носитель, поставляемый вместе с другим аппаратным устройством или как часть другого аппаратного устройства, но также он может быть поставляться и в других формах, например, через Интернет или другие проводные или беспроводные телекоммуникационные системы.

Сравнительные признаки, используемые в формуле изобретения, не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения.

Последовательности раскрыты в основной части описания и в отдельном списке последовательностей в соответствии со стандартом ВОИС ст. 25. SEQ ID, указанные вместе с определенным номером, должны быть одинаковыми в основной части описания и в отдельном списке последовательностей. Так, например, SEQ ID No: 1 должна определять одну и ту же последовательность как в основной части описания, так и в отдельном списке последовательностей. В случае несоответствия между определением последовательности в основном тексте описания и в отдельном списке последовательностей (например, если SEQ ID No 1 в основном тексте описания ошибочно соответствует SEQ ID No 2 в отдельном списке последовательностей), ссылка на конкретную последовательность в данной заявке, а в частности, на конкретные варианты осуществления изобретения, должна рассматриваться как ссылка на последовательность в основном описании заявки, а не в отдельном списке последовательностей. Другими словами, несоответствие между определением/обозначением последовательности в основной части описания и в отдельном списке последовательностей должно быть устранено путем исправления последовательностей и их обозначений в отдельном списке последовательностей, раскрытых в основной части заявки, которая включает описание, примеры, чертежи и формулу изобретения.

Патентные признаки формулы изобретения

1. Вакцина для применения в профилактике и/или лечении заболевания, содержащая аденовирусный вектор, способный кодировать вирусоподобную частицу (VLP), где указанная VLP презентует неактивный иммуносупрессорный домен (ISD).
2. Вакцина по п.1 для профилактики и/или лечения рака.
3. Вакцина по п.1 или 2, где ISD имеет пептидную последовательность

LANQINDLRQTVIW (SEQ ID NO: 1), LASQINDLRQTVIW (SEQ ID NO: 2), LQNRRLDLLTAKEGGL (SEQ ID NO: 3), LQNRRLDLLTAERGGT (SEQ ID NO: 4), LQNRRLDMLTAAQGGI (SEQ ID NO: 5) или YQNRLALDYLLAAEGGV (SEQ ID NO: 6), в которых по меньшей мере одна из аминокислот делетирована или заменена другой аминокислотой.

4. Вакцина по п.3, где аминокислота, отличающаяся от исходной, выбрана из природных аминокислот.

5. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где по меньшей мере одна из аминокислот в области из 10 аминокислот, расположенных выше или ниже ISD, заменена другой аминокислотой.

6. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где VLP также презентует белок оболочки эндогенного ретровируса (ERV) или его иммуногенную часть.

7. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где белок оболочки ERV представляет собой белок человеческого эндогенного ретровируса (HERV) или его иммуногенную часть.

8. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где указанный HERV выбран из группы, состоящей из HERV-K, HERV-H, HERV-3, HERV-FRD и HERV-E.

9. Вакцина по любому из п.п. 1-8, где HERV-K выбран из группы, состоящей из HERV-K108 (=ERVК-6), ERVK-19, HERV-K115 (=ERVК-8), ERVK-9, HERV-K113, ERVK-21, ERVK-25, HERV-K102 (=ERVК-7), HERV-K101 (=ERVК-24) и HERV-K110 (=ERVК-18); HERV-H выбран из группы, состоящей из HERV-H19 (=HERV-H_2q24.3) и HERV-H_2q24.1; HERV-W выбран в качестве ERVW-1 (=синцитина-1); и HERV-FRD выбран в качестве ERVFRD-1 (=синцитина-2).

10. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где аденовирусный вектор происходит от типов аденовируса млекопитающих, типов человеческого аденовируса, типов аденовируса шимпанзе или типов аденовируса гориллы.

11. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где человеческой аденовирусный вектор происходит от векторов группы D, человеческого аденовируса серотипа Ad5, человеческого аденовируса серотипа Ad19a, человеческого аденовируса серотипа Ad26 или серотипов аденовируса шимпанзе.

12. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где аденовирусный вектор представляет собой аденовирус серотипа 5 (Ad5).

13. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где белковый продукт аденовирусного вектора включает белок gag, пептид 2A и белок оболочки (Env).

14. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где белок gag представляет собой экзогенный ретровирусный белок gag или эндогенный ретровирусный белок gag.

15. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где белок Env содержит поверхностную единицу (gp70), сайт расщепления и трансмембранную единицу (p15E).

16. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где трансмембранная единица (p15E) содержит гибридный пептид, иммуносупрессорный домен (ISD),

трансмембранный якорь и/или цитоплазматический хвост.

17. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где p15E или его иммуногенная часть связаны с аденовирусным капсидным белком pIX.

18. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где сигнальный пептид, кодируемый аденовирусным вектором, заменен сигнальным пептидом люциферазы *Gaussia* (LucSP).

19. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где трансмембранный якорь и цитоплазматический хвост, кодируемые аденовирусным вектором, заменены трансмембранным доменом и цитоплазматическим хвостом гемагглютинина вируса гриппа А.

20. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где трансмембранный якорь и цитоплазматический хвост, кодируемые аденовирусным вектором, заменены трансмембранным доменом и цитоплазматическим хвостом гемагглютинина H3N2 вируса гриппа А (HA-ТМСТ).

21. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где последовательность тримеризации расположена рядом с сигнальным пептидом.

22. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где последовательность тримеризации представляет собой GCN4.

23. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где VLP содержит белок gag.

24. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где белок gag представляет собой экзогенный ретровирусный белок gag или эндогенный ретровирусный белок gag.

25. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где VLP продуцируется в клетке организма пациента, инфицированного аденовирусным вектором.

26. Вакцина по любому из предшествующих пунктов, где VLP продуцируется в изолированной клетке млекопитающего.

27. Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая белок-мишень, способный образовывать вирусоподобную частицу (VLP), где белок-мишень содержит иммуносупрессорный домен (ISD), где указанный ISD является неактивным.

28. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.27, где ISD имеет пептидную последовательность LANQINDLRQTVIW (SEQ ID NO: 1), LASQINDLRQTVIW (SEQ ID NO: 2), LQNRRGLDLLTAEKGGL (SEQ ID NO: 3), LQNRRALDLLTAERGGT (SEQ ID NO: 4), LQNRRGLDMLTAAQGGI (SEQ ID NO: 5) или YQNRLALDYLLAAEGGV (SEQ ID NO: 6), в которых по меньшей мере одна из аминокислот делетирована или заменена другой аминокислотой.

29. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.п. 27 или 28, где аминокислота, отличающаяся от исходной, выбрана из природных аминокислот.

30. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.п. 27-29, где по меньшей мере одна из аминокислот в области из 10 аминокислот, расположенных выше или ниже ISD, заменена другой аминокислотой.

31. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.п. 27-30, где VLP также презентует

белок оболочки эндогенного ретровируса (ERV) или его иммуногенную часть.

32. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.п. 27-31, где белок оболочки ERV представляет собой белок человеческого эндогенного ретровируса (HERV) или его иммуногенную часть.

33. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.п. 27-32, где указанный HERV выбран из группы, состоящей из HERV-K, HERV-H, HERV-W, HERV-FRD и HERV-E.

34. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.п. 27-33, где HERV-K выбран из группы, состоящей из HERV-K108 (=ERVК-6), ERVK-19, HERV-K115 (=ERVК-8), ERVK-9, HERV-K113, ERVK-21, ERVK-25, HERV-K102 (=ERVК-7), HERV-K101 (=ERVК-24), и HERV-K110 (=ERVК-18); HERV-H выбран из группы, состоящей из HERV-H19 (=HERV-H_2q24.3), и HERV-H_2q24.1; HERV-W выбран в качестве ERVW-1 (= синцитина-1); а HERV-FRD выбран в качестве ERVFRD-1 (=синцитина-2).

35. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.п. 27-31, где аденовирусный вектор происходит от типов аденовирусов млекопитающих, типов человеческих аденовирусов, типов аденовирусов шимпанзе или типов аденовирусов горилл.

36. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.п. 27-35, где человеческой аденовирусный вектор происходит от векторов группы D, человеческого аденовируса серотипа Ad5, человеческого аденовируса серотипа Ad19a, человеческого аденовируса серотипа Ad26 или серотипов аденовируса шимпанзе.

37. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.п. 27-36, где аденовирусный вектор представляет собой аденовирус серотипа 5 (Ad5).

38. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.п. 27-37, где белковый продукт аденовирусного вектора включает белок gag, пептид 2A и белок оболочки (Env).

39. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.п. 27-38, где белок gag представляет собой экзогенный ретровирусный белок gag или эндогенный ретровирусный белок gag.

40. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.п. 27-39, где белок Env содержит поверхностную единицу (gp70), сайт расщепления и трансмембранную единицу (p15E).

41. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.п. 27-40, где трансмембранная единица (p15E) содержит гибридный пептид, иммуносупрессорный домен (ISD), трансмембранный якорь и/или цитоплазматический хвост.

42. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.п. 27-41, где p15E или его иммуногенная часть связаны с аденовирусным капсидным белком pIX.

43. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.п. 27-42, где сигнальный пептид, кодируемый аденовирусным вектором, заменен сигнальным пептидом люциферазы Gaussia (LucSP).

44. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.п. 27-43, где трансмембранный якорь и цитоплазматический хвост, кодируемые аденовирусным вектором, заменены трансмембранным доменом и цитоплазматическим хвостом гемагглютинаина вируса гриппа А.

45. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.п. 27-44, где трансмембранный якорь и

цитоплазматический хвост, кодируемые аденовирусным вектором, заменены трансмембранным доменом и цитоплазматическим хвостом гемагглютинина H3N2 вируса гриппа А (HA-ТМСТ).

46. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.п. 27-45, где последовательность тримеризации расположена рядом с сигнальным пептидом.

47. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.п. 27-46, где последовательность тримеризации представляет собой GCN4.

48. Белок, содержащий продукт экспрессии конструкции нуклеиновой кислоты по любому из п.п. 27-47.

49. Вирусоподобная частица (VLP), содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из п.п. 27-47.

50. Вакцина по любому из п.п. 1-27 для применения в профилактике и/или лечении рака.

51. Вакцина по любому из п.п. 1-27 для применения в профилактике и/или лечении рака, включающих стадию примирования пациента конструкцией нуклеиновой кислоты по любому из п.п. 27-47 по меньшей мере за 5 дней до введения бустер-дозы вакцины по любому из п.п. 1-26.

52. Вакцина по любому из п.п. 1-26 для применения в профилактике и/или лечении рака, включающих стадию последующего лечения пациента через 5 дней или более после введения пациенту вакцины по любому из п.п. 1-26 на основе вируса, кодирующего VLP, отличающуюся от VLP, происходящей от аденовирусного вектора.

53. Вакцина по п.52, где кодируемая вирусом VLP, отличающаяся от VLP, происходящей от аденовирусного вектора, представляет собой VLP, происходящую от модифицированного вируса осповакцины Анкары (MVA).

54. Вакцина для применения в профилактике и/или лечении заболевания, включающая вирусный вектор, способный кодировать вирусоподобную частицу (VLP), где указанная VLP презентует неактивный иммуносупрессорный домен (ISD).

55. Вакцина по п.54, где вирусный вектор происходит от модифицированного вируса осповакцины Анкары (MVA), адено-ассоциированного вируса (AAV) или лентивируса.

56. Способ профилактики и/или лечения рака, включающий стадию введения вакцины по любому из п.п. 1-26.

57. Способ для профилактики и/или лечения рака, включающий стадию примирования пациента нуклеиновой кислотой по любому из п.п. 27-47 по меньшей мере за 5 дней до введения бустер-дозы вакцины по любому из п.п. 1-26.

58. Способ профилактики и/или лечения рака, включающий стадию последующего лечения пациента через 5 дней или более после введения пациенту вакцины по любому из п.п. 1-20 на основе вируса, кодирующего VLP, отличающуюся от VLP, происходящей от аденовирусного вектора.

59. Способ по п.58, где кодируемая вирусом VLP, отличающаяся от VLP,

происходящей от аденовирусного вектора, представляет собой VLP, происходящую от модифицированного вируса осповакцины Анкары (MVA).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты для применения в профилактике и/или лечении заболевания, причем указанная молекула нуклеиновой кислоты кодирует белок оболочки эндогенного ретровируса (ERV) или его иммуногенную часть, где ISD указанного белка содержит мутации, которые делают ISD неактивным.

2. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.1 для применения по п.1, причем вектор предпочтительно представляет собой аденовирусный вектор, более предпочтительно, аденовирусный вектор, происходящий от типов аденовируса млекопитающих, типов человеческого аденовируса, серотипов аденовируса шимпанзе или серотипов аденовируса гориллы, где человеческий аденовирусный вектор происходит от векторов группы D, человеческого аденовируса серотипа Ad5, человеческого аденовируса серотипа Ad19a, человеческого аденовируса серотипа Ad26 или серотипа аденовируса шимпанзе, и где аденовирусный вектор представляет собой аденовирус серотипа 5 (Ad5) или аденовирус серотипа 19 (Ad19).

3. Вектор по п.2 для применения по п.2, где указанный вектор кодирует вирусоподобную частицу (VLP), причем указанная VLP презентует белок оболочки эндогенного ретровируса (ERV) или его иммуногенную часть с неактивным иммуносупрессорным доменом (ISD).

4. Белок, содержащий продукт экспрессии вектора по п.3 для применения в профилактике и/или лечении заболевания.

5. Вакцина, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или вектор по любому из предшествующих пунктов или белок по пункту формулы изобретения для применения в профилактике и/или лечении заболевания.

6. Молекула нуклеиновой кислоты, вектор, белок или вакцина по любому из предшествующих пунктов для применения по предшествующему пункту, где заболевание представляет собой рак, более предпочтительно, ERV-экспрессирующий рак, еще более предпочтительно, рак выбранный из рака предстательной железы, рака молочной железы, рака яичника, лимфомы, меланомы, лейкоза, саркомы, рака прямой и ободочной кишки, рака яичек, рака легких и рака печени.

7. Молекула нуклеиновой кислоты, вектор или вакцина по любому из предшествующих пунктов для применения по предшествующему пункту, где ISD имеет пептидную последовательность LANQINDLRQTVIW (SEQ ID NO: 1), LASQINDLRQTVIW (SEQ ID NO: 2), LQNRRLDLLTAEKGGI (SEQ ID NO: 3), LQNRRLDLLTAERGGT (SEQ ID NO: 4), LQNRRLDMLTAAQGGI (SEQ ID NO: 5), YQNRLALDYLLAEGGV (SEQ ID NO: 6) или NSQSSIDQKLANQINDLRQT (SEQ ID NO: 49), в которых по меньшей мере одна из аминокислот заменена другой аминокислотой.

8. Молекула нуклеиновой кислоты, вектор или вакцина по любому из предшествующих пунктов для применения по предыдущему пункту, где по меньшей мере, одна из аминокислот в области из 10 аминокислот, расположенных выше или ниже ISD,

заменена другой аминокислотой.

9. Молекула нуклеиновой кислоты, вектор или вакцина по любому из предшествующих пунктов для применения по предшествующему пункту, где белок ERV представляет собой белок человеческого эндогенного ретровируса (HERV) или его иммуногенную часть, где указанный HERV выбран из группы, состоящей из HERV-K, HERV-H, HERV-W, HERV-FRD и HERV-E, и где HERV-K выбран из группы, состоящей из HERV-K108 (=ERVK-6), ERVK-19, HERV-K115 (=ERVK-8), ERVK-9, HERV-K113, ERVK-21, ERVK-25, HERV-K102 (=ERVK-7), HERV-K101 (=ERVK-24) и HERV-K110 (=ERVK-18); HERV-H выбран из группы, состоящей из HERV-H19 (=HERV-H_2q24.3) и HERV-H_2q24.1; HERV-W выбран в качестве ERVW-1 (=синцитина-1); и HERV-FRD выбран в качестве ERVFRD-1 (=синцитина -2).

10. Вектор по любому из п.п. 3-8 или вакцина по любому из предшествующих пунктов для применения по любому из предшествующих пунктов, где белковый продукт аденовирусного вектора включает белок gag, пептид 2A и белок оболочки (Env), где белок Env содержит поверхностную единицу (gp70), сайт расщепления и трансмембранную единицу (p15E), где трансмембранная единица (p15E) содержит гибридный пептид, иммуносупрессорный домен (ISD), трансмембранный якорь и цитоплазматический хвост, и где p15E или его иммуногенная часть связаны с аденовирусным капсидным белком pIX, и/или где сигнальный пептид, кодируемый аденовирусным вектором, заменен сигнальным пептидом люциферазы Gaussia (LucSP), и/или где трансмембранный якорь и цитоплазматический хвост, кодируемые аденовирусным вектором, заменены трансмембранным доменом и цитоплазматическим хвостом гемагглютинина H3N2 вируса гриппа А (HA-ТМСТ).

11. Вакцина по любому из предшествующих пунктов для применения в профилактике и/или лечении рака, включающих стадию примирования пациента аденовирусным вектором по меньшей мере за 5 дней до введения бустер-дозы вакцины по любому из предшествующих пунктов.

12. Вакцина по любому из предшествующих пунктов для применения в профилактике и/или лечении рака, включающем стадию последующего лечения пациента через 5 дней или более после введения пациенту вакцины на основе вируса, кодирующего VLP, отличающуюся от VLP, происходящей от аденовирусного вектора, где вирус, кодирующий VLP, отличающуюся от VLP, происходящей от аденовирусного вектора, представляет собой VLP, происходящую от модифицированного вируса осповакцины Анкары (MVA).

13. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок Gag и белок оболочки ERV (Env) или его иммуногенную часть, в которой нативная геномная структура, соединяющая Gag и Env, была заменена функционально присоединенным линкером, где линкер предпочтительно представляет собой p2A.

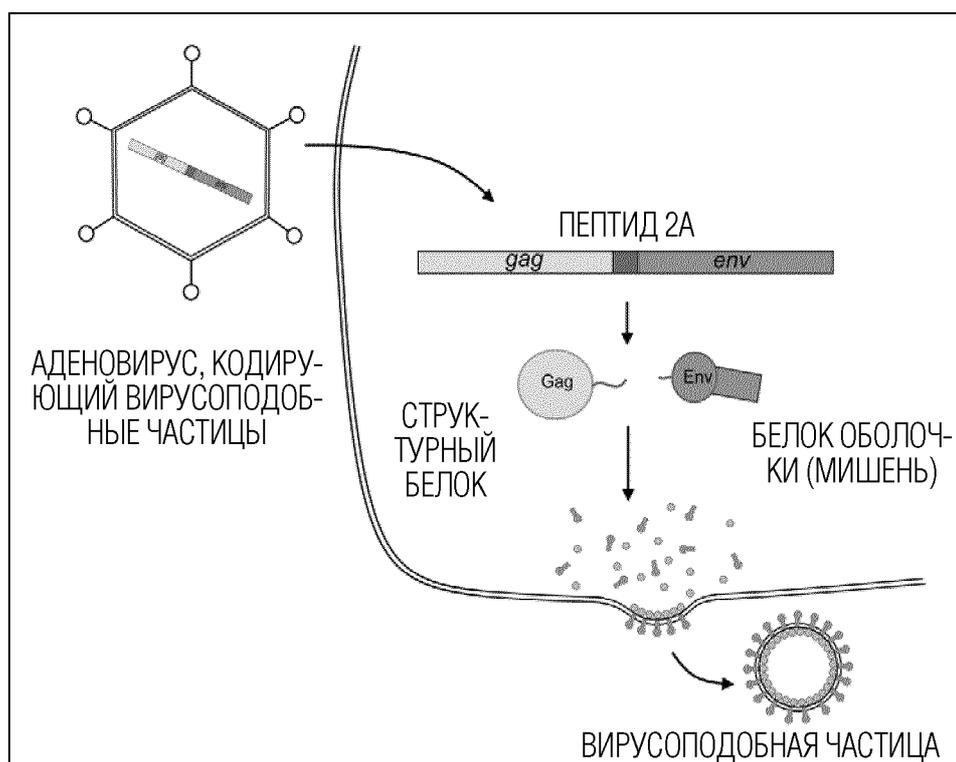
14. VLP, кодируемая молекулой нуклеиновой кислоты по п.13.

15. Молекула нуклеиновой кислоты по п.13 или VLP по п.14 для применения в

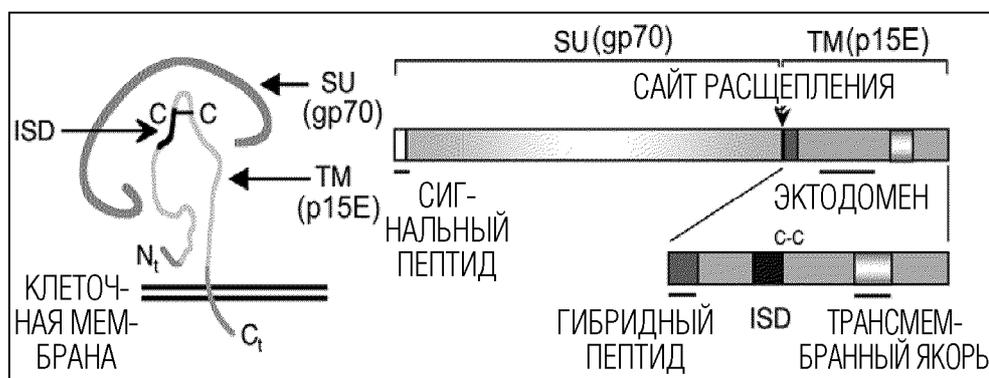
профилактике и/или лечении заболевания.

16. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, VLP по п.14 или молекула нуклеиновой кислоты или VLP по п.15 для применения по п.15, где ERV представляет собой HERV-K, предпочтительно, HERV-K 113.

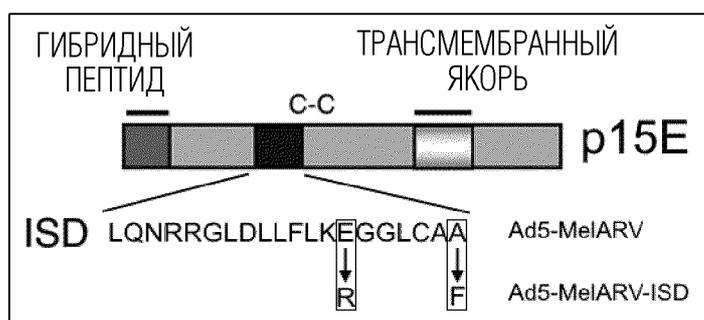
По доверенности



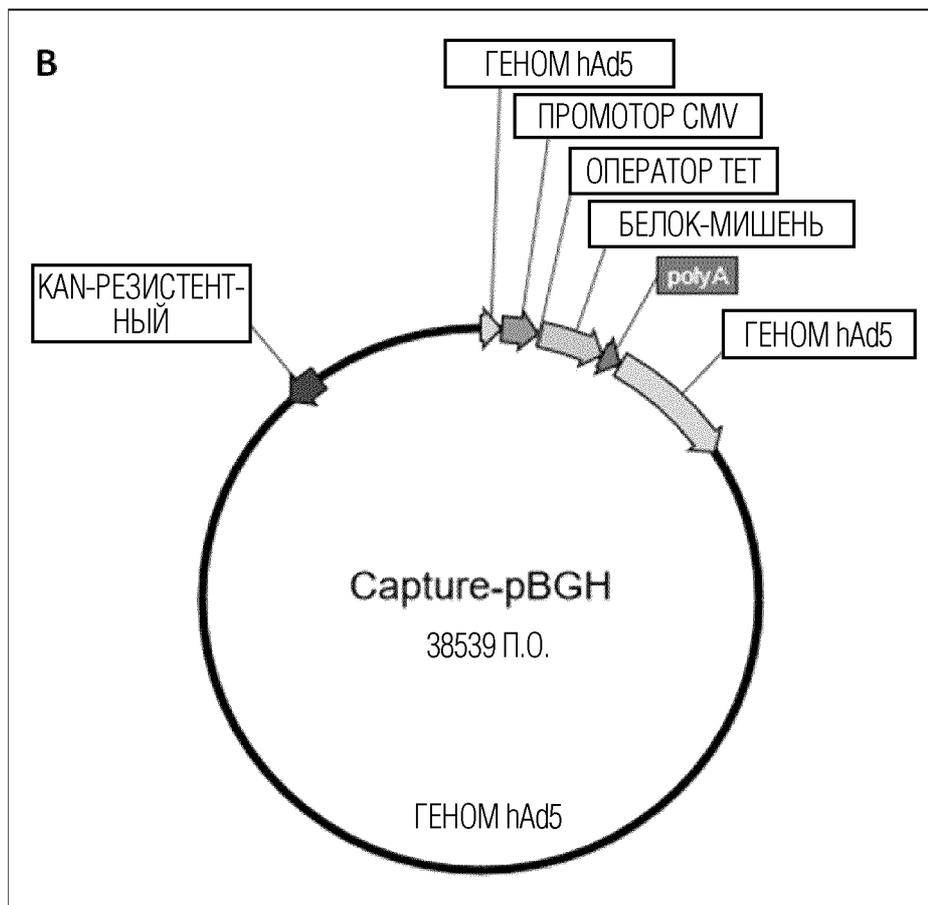
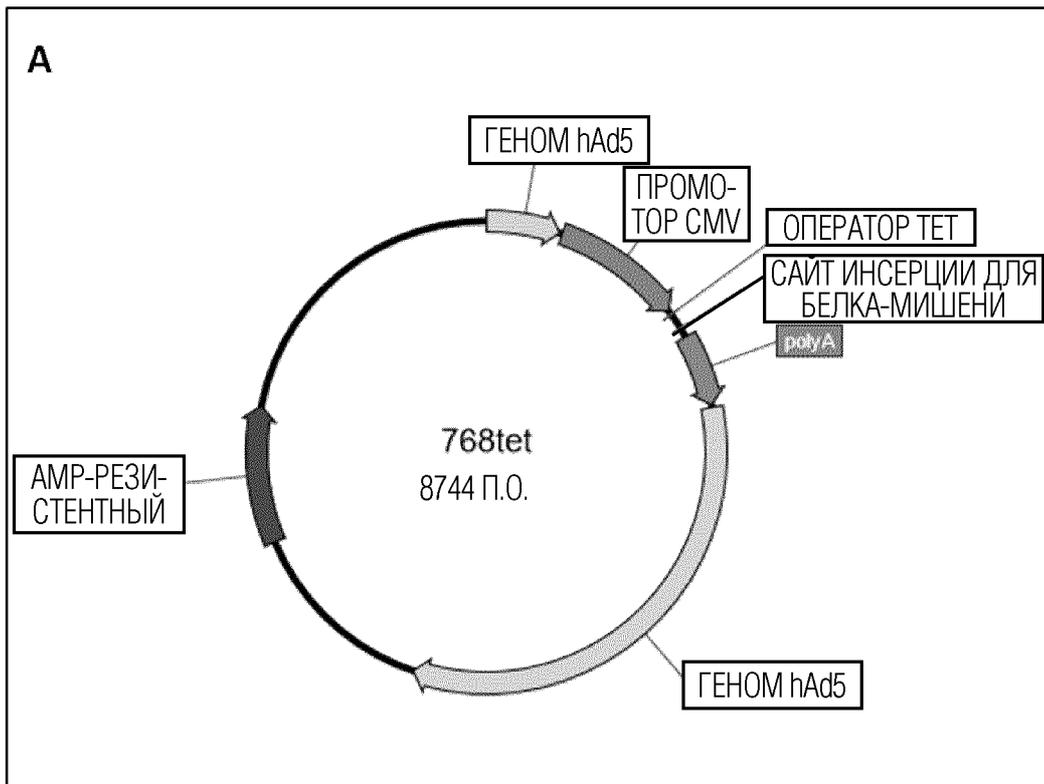
ФИГ. 1



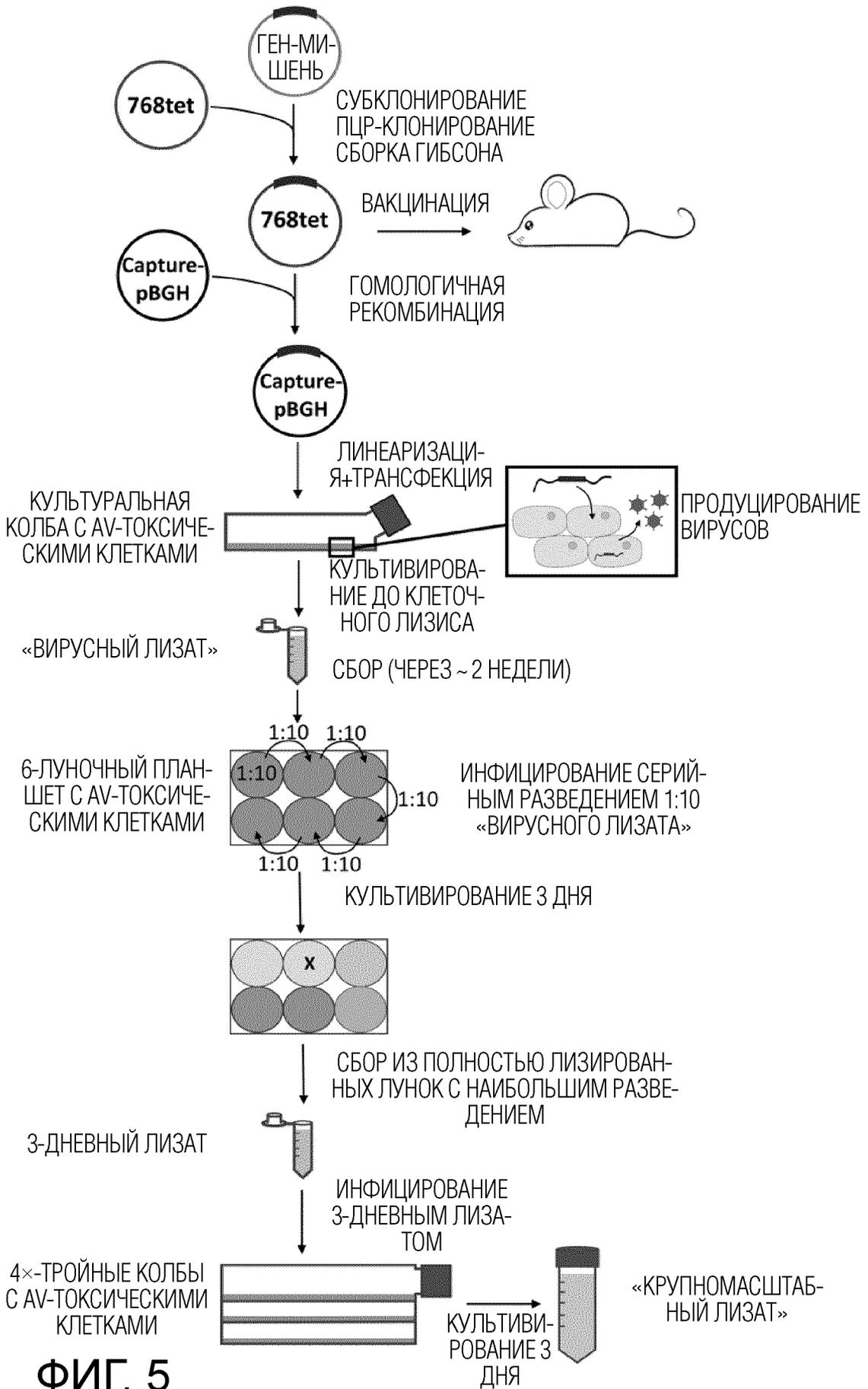
ФИГ. 2



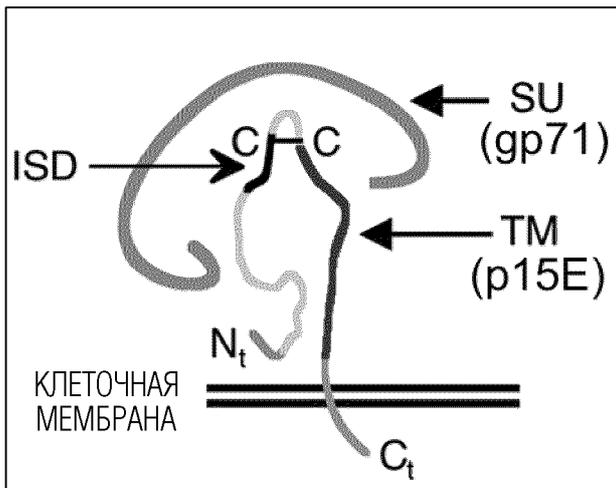
ФИГ. 3



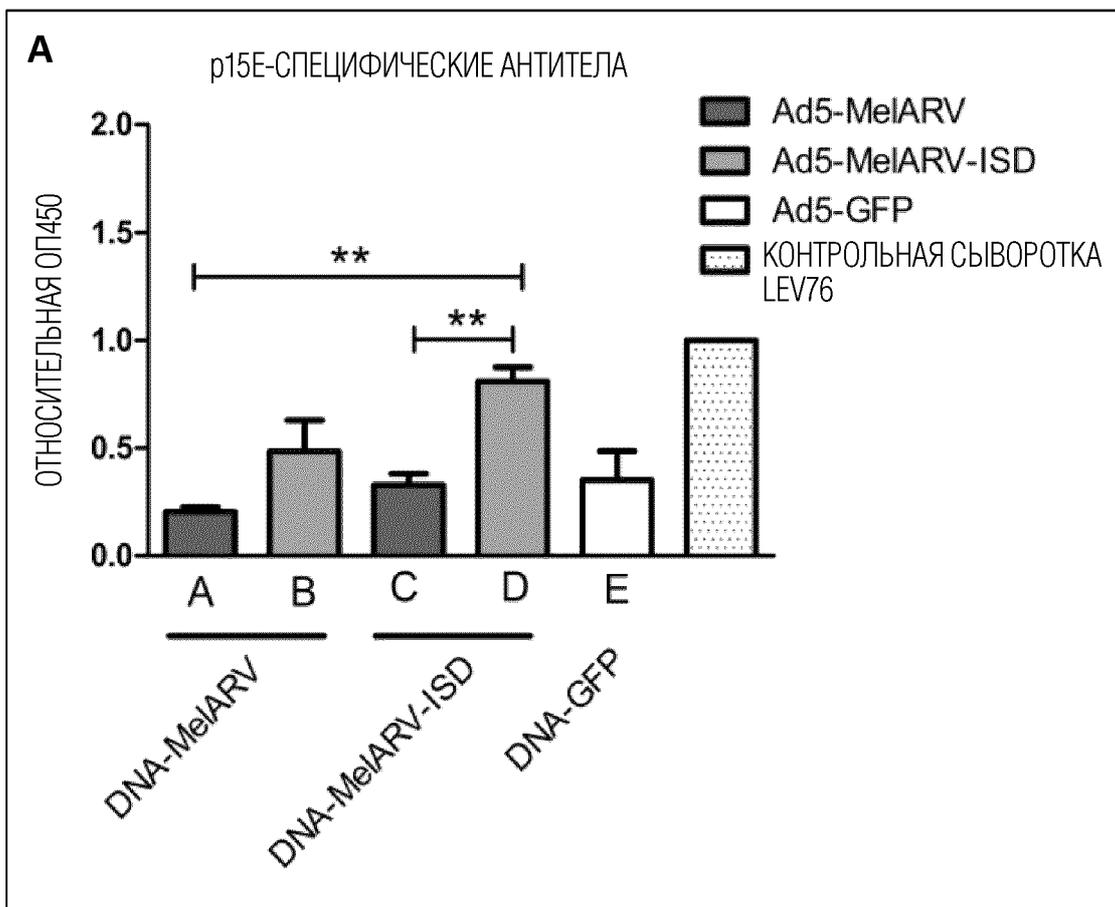
ФИГ. 4



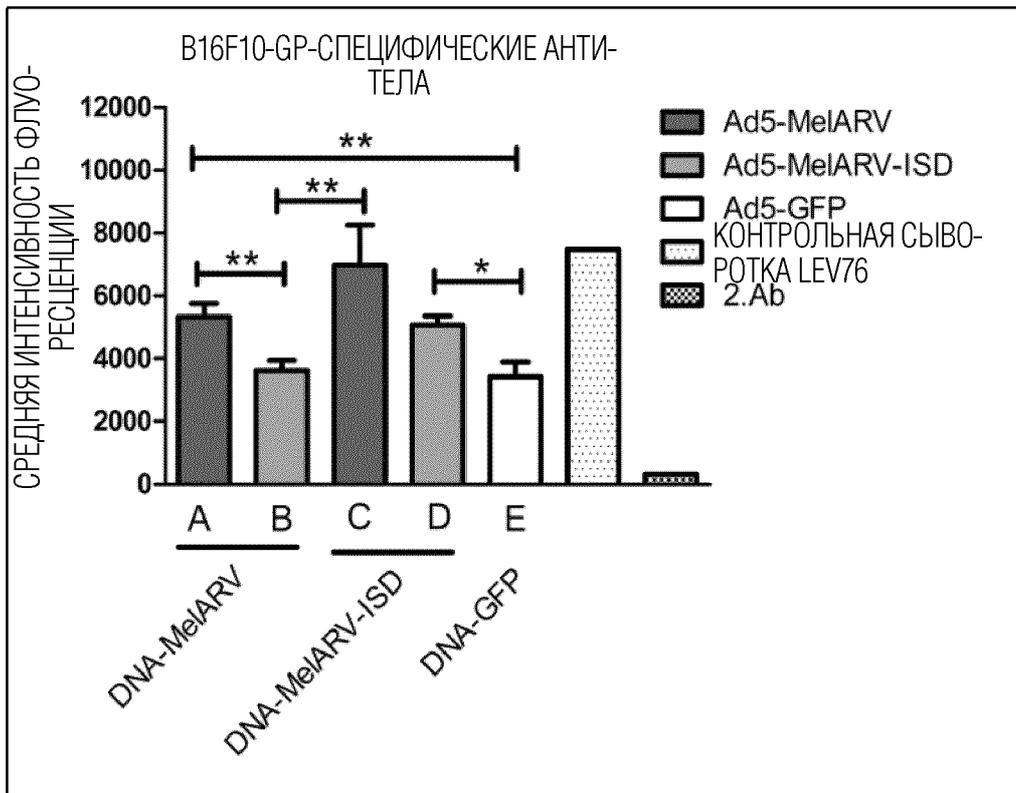
ФИГ. 5



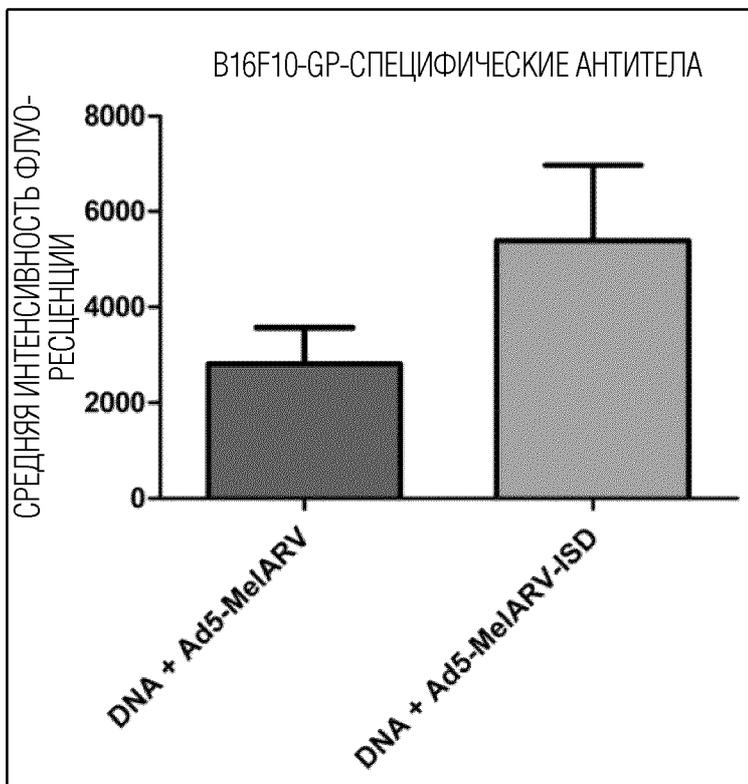
ФИГ. 6



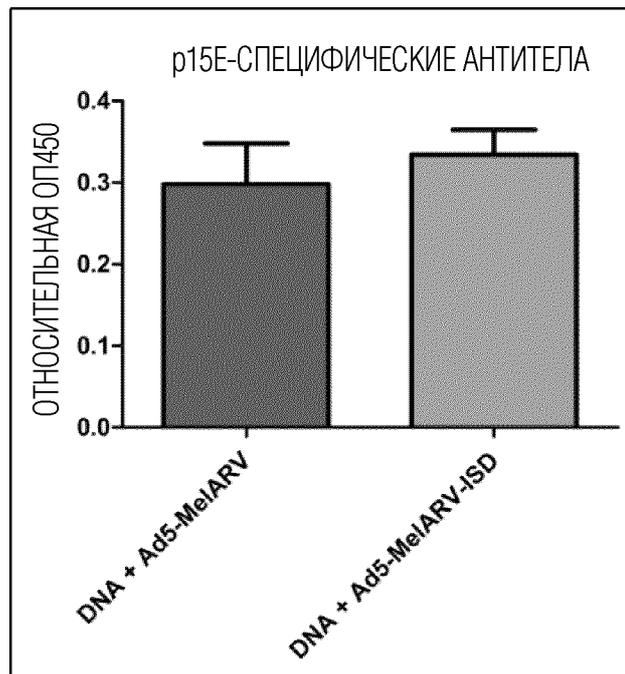
ФИГ. 7А



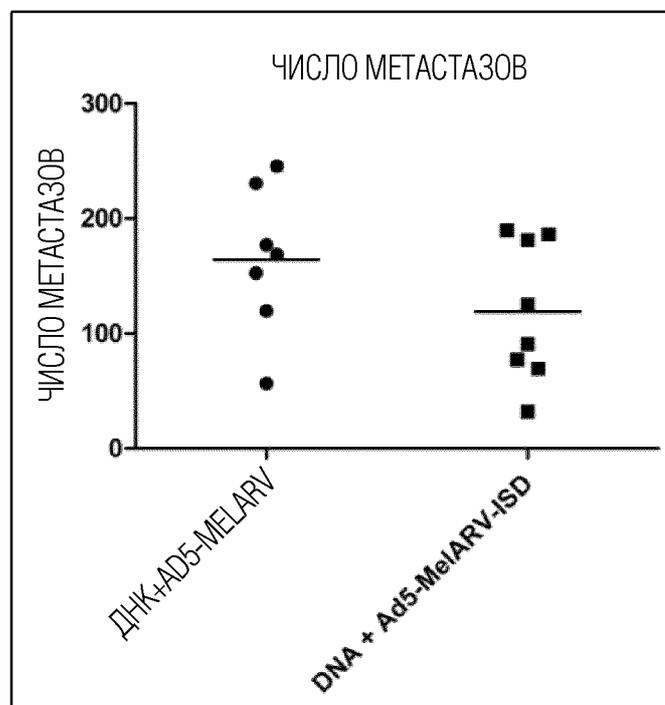
ФИГ. 7В



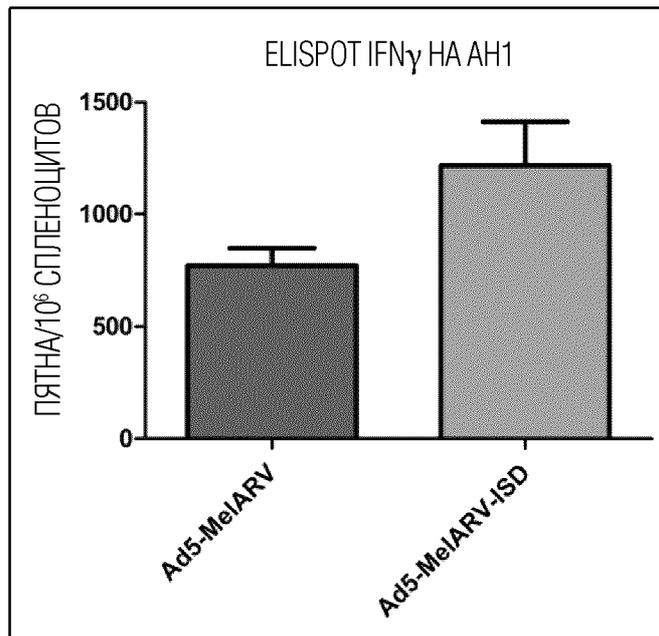
ФИГ. 8А



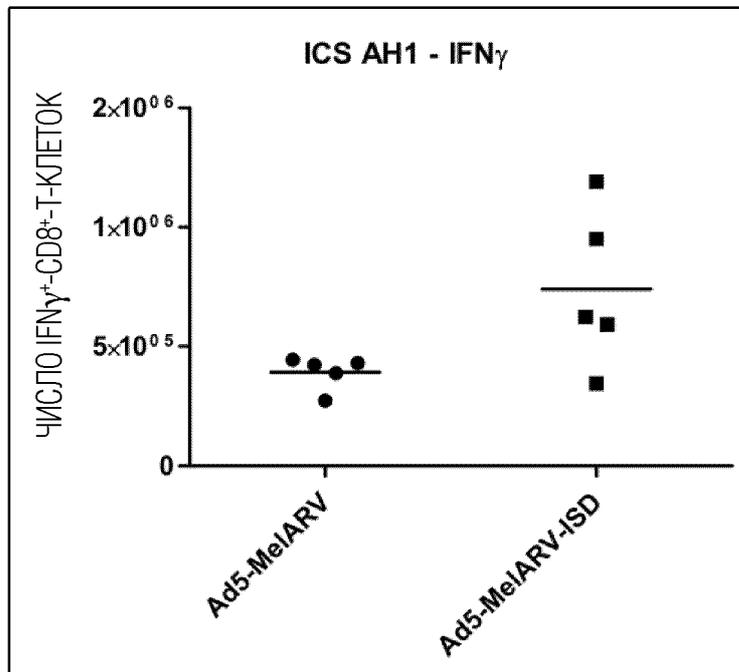
ФИГ. 8В



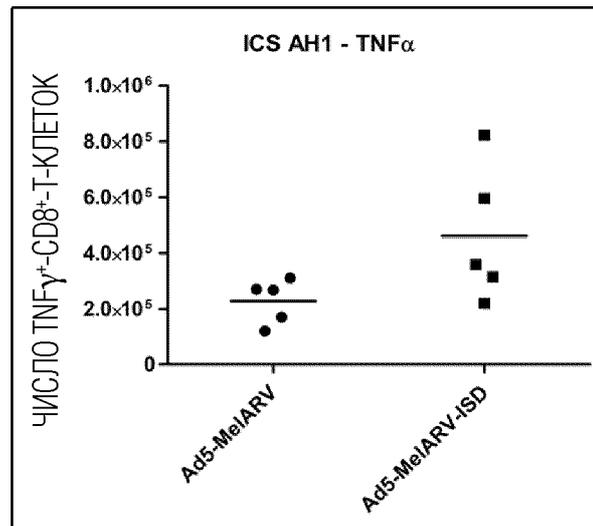
ФИГ. 8С



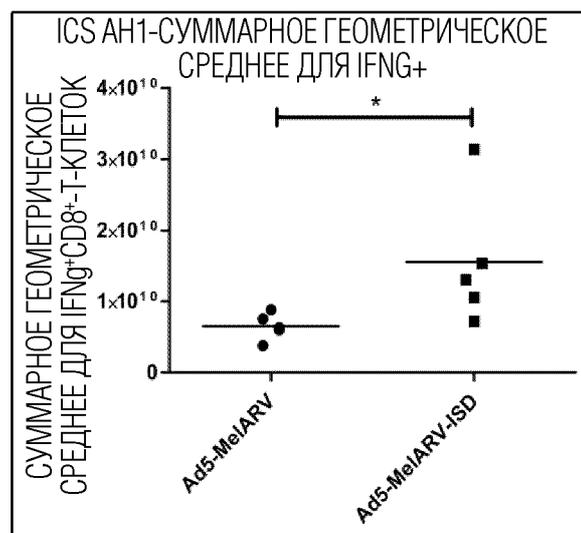
ФИГ. 9



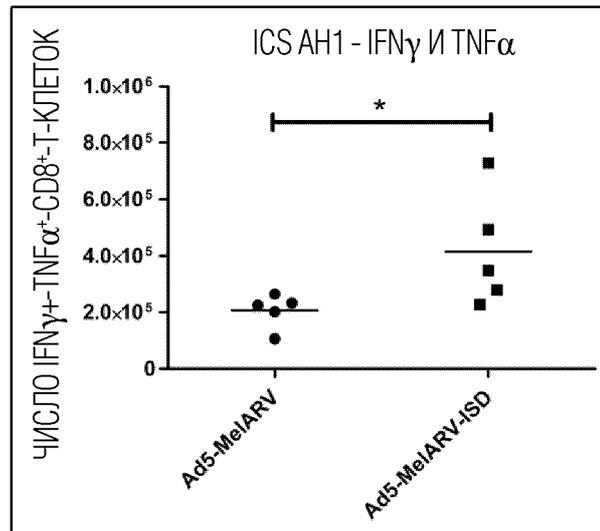
ФИГ. 10А



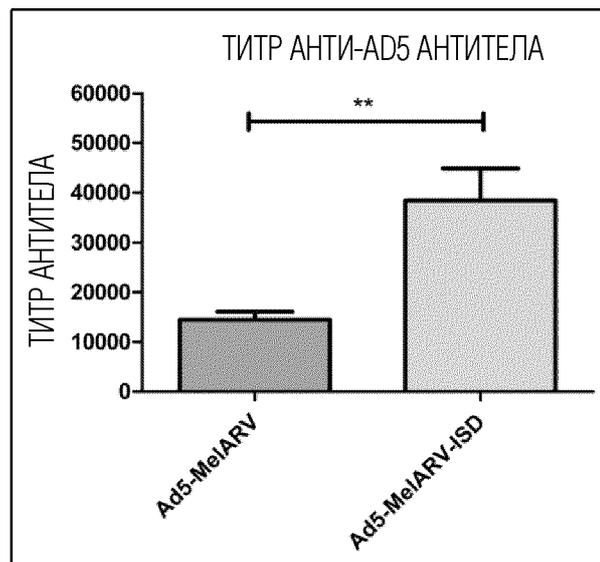
ФИГ. 10В



ФИГ. 10С



ФИГ. 10D



ФИГ. 11

1) pIX-p15E:

TGTT[...]EVVLQNRRLDLLFLKEGGLCAALKEECCFYADHTGLVRDSMAKLRERLSQRQKLFESQQGWFEGLFN

2) pIX-p15E-ISD:

TGTT[...]EVVLQNRRLDLLFLK[#]RGGLCA[#]FLKEECCFYADHTGLVRDSMAKLRERLSQRQKLFESQQGWFEGLFN

3) pIX-p15E-trunc-wC:

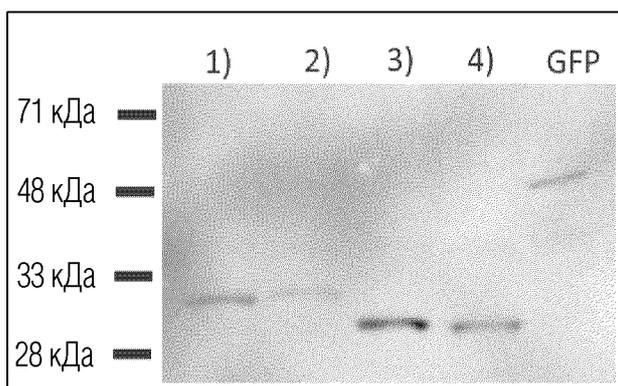
TGTT[...]EVVLQNRRLDLLFLKEGGLC

4) pIX-p15E-trunc-w/oC:

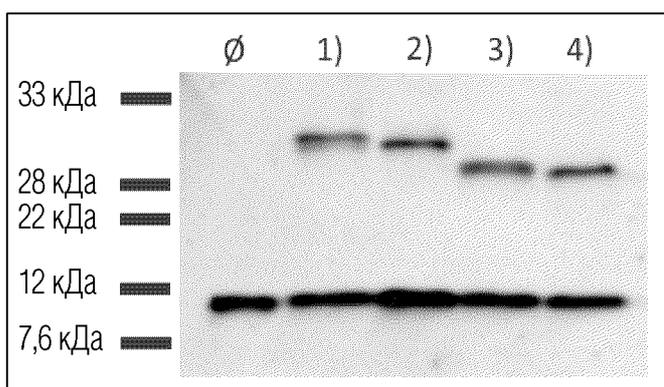
TGTT[...]EVVLQNRRLDLLFLKEGGL

ИММУНОСУПРЕССОРНЫЙ ДОМН ISD ПОДЧЕРКНУТ
МУТАЦИЯ ISD ПОМЕЧЕНА «#»

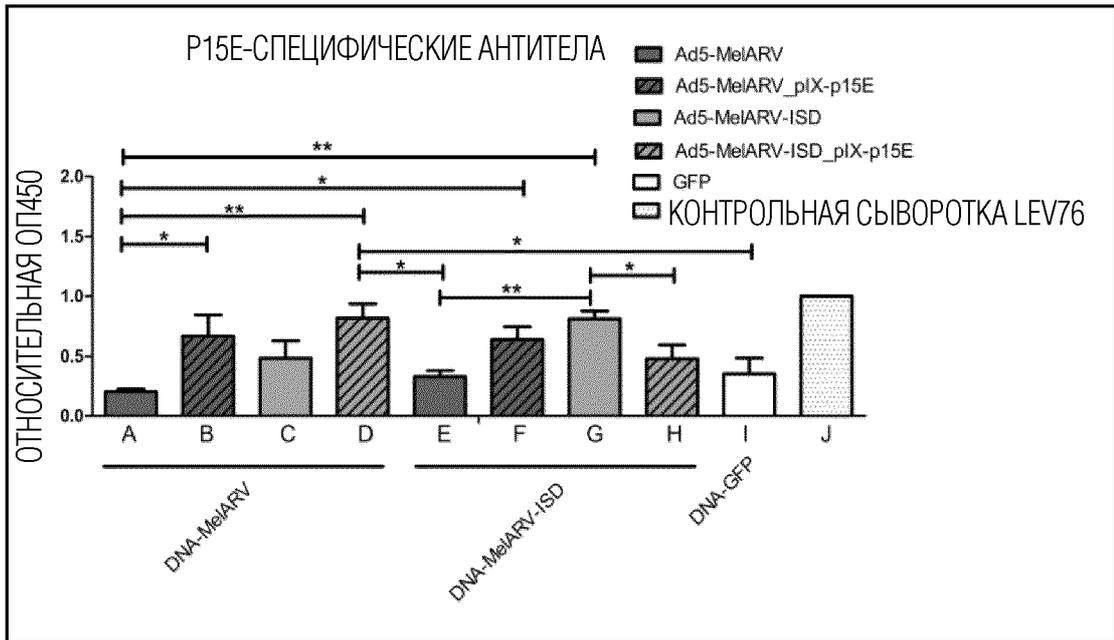
ФИГ. 12



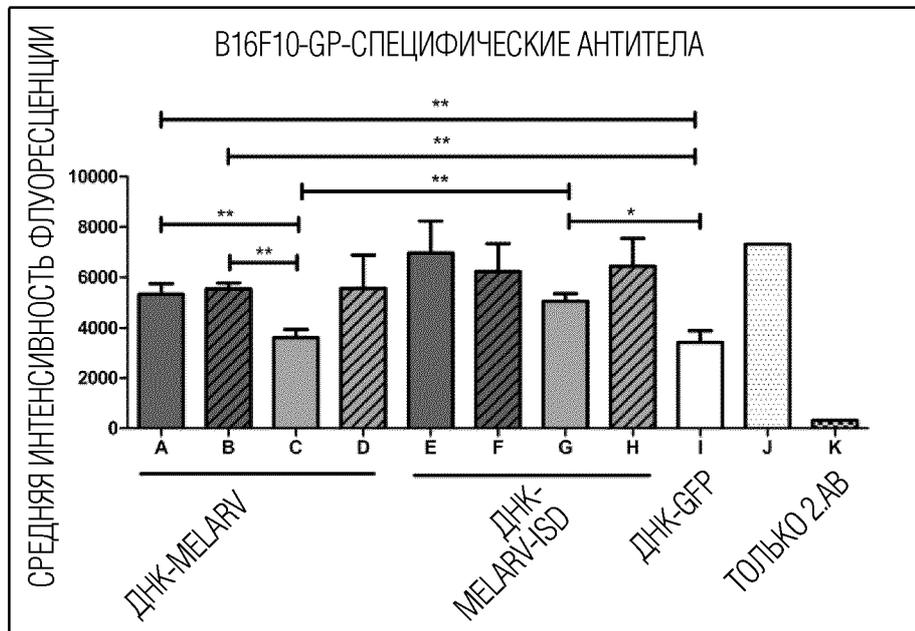
ФИГ. 13А



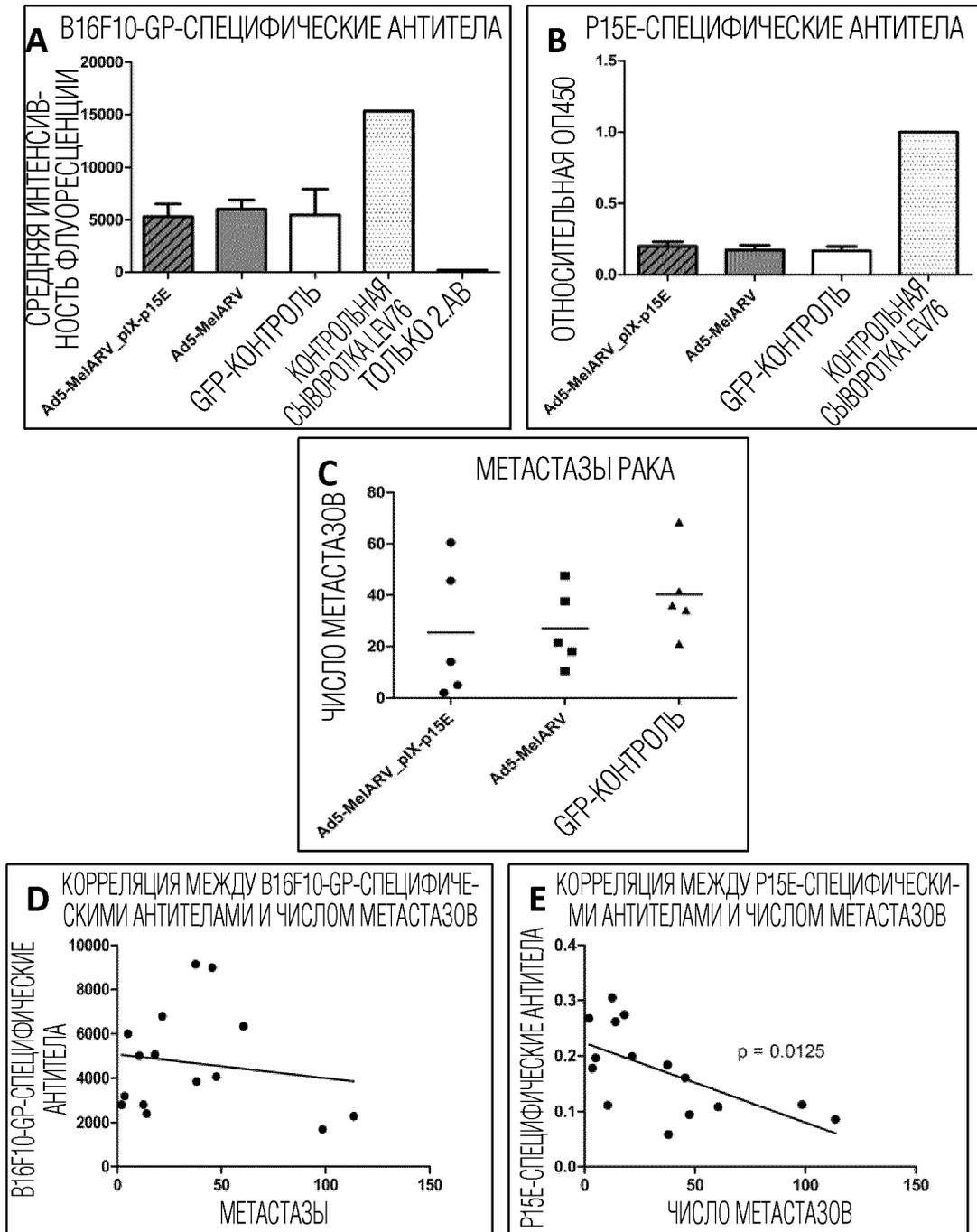
ФИГ. 13В



ФИГ. 14А



ФИГ. 14В

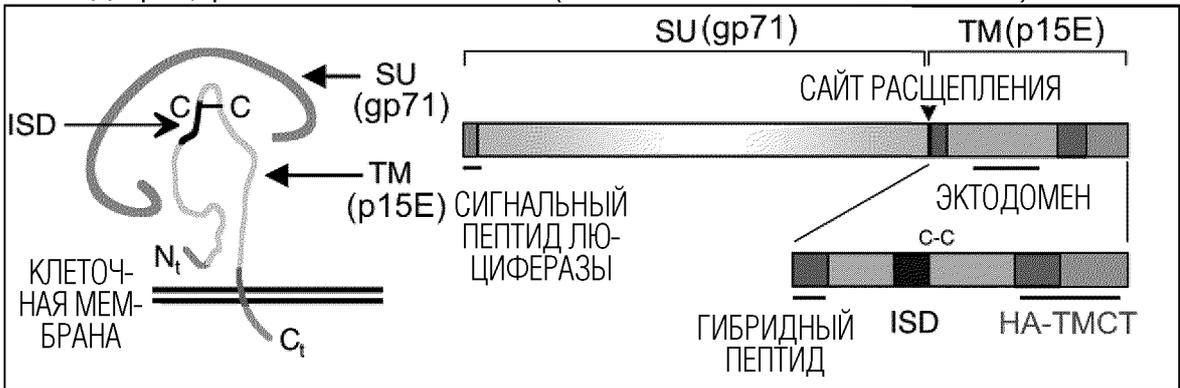


ФИГ. 15

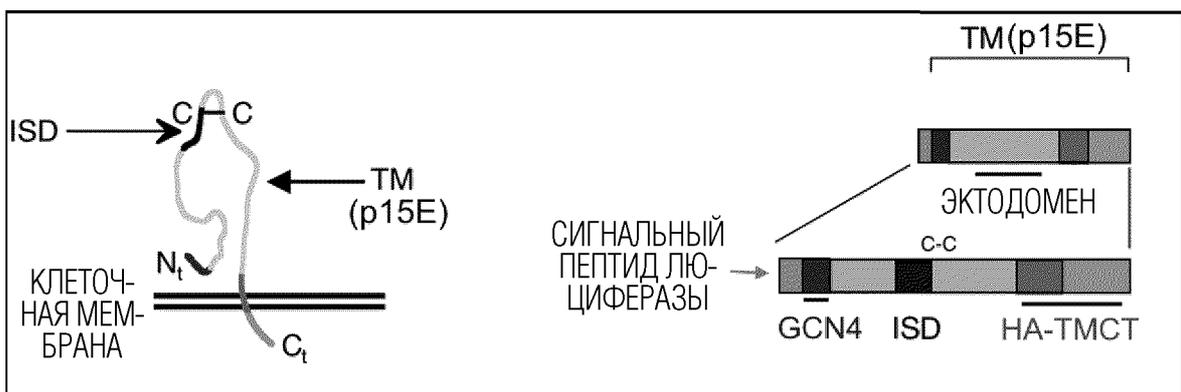
Нативный Env MelARV (Ad5-MelARV)



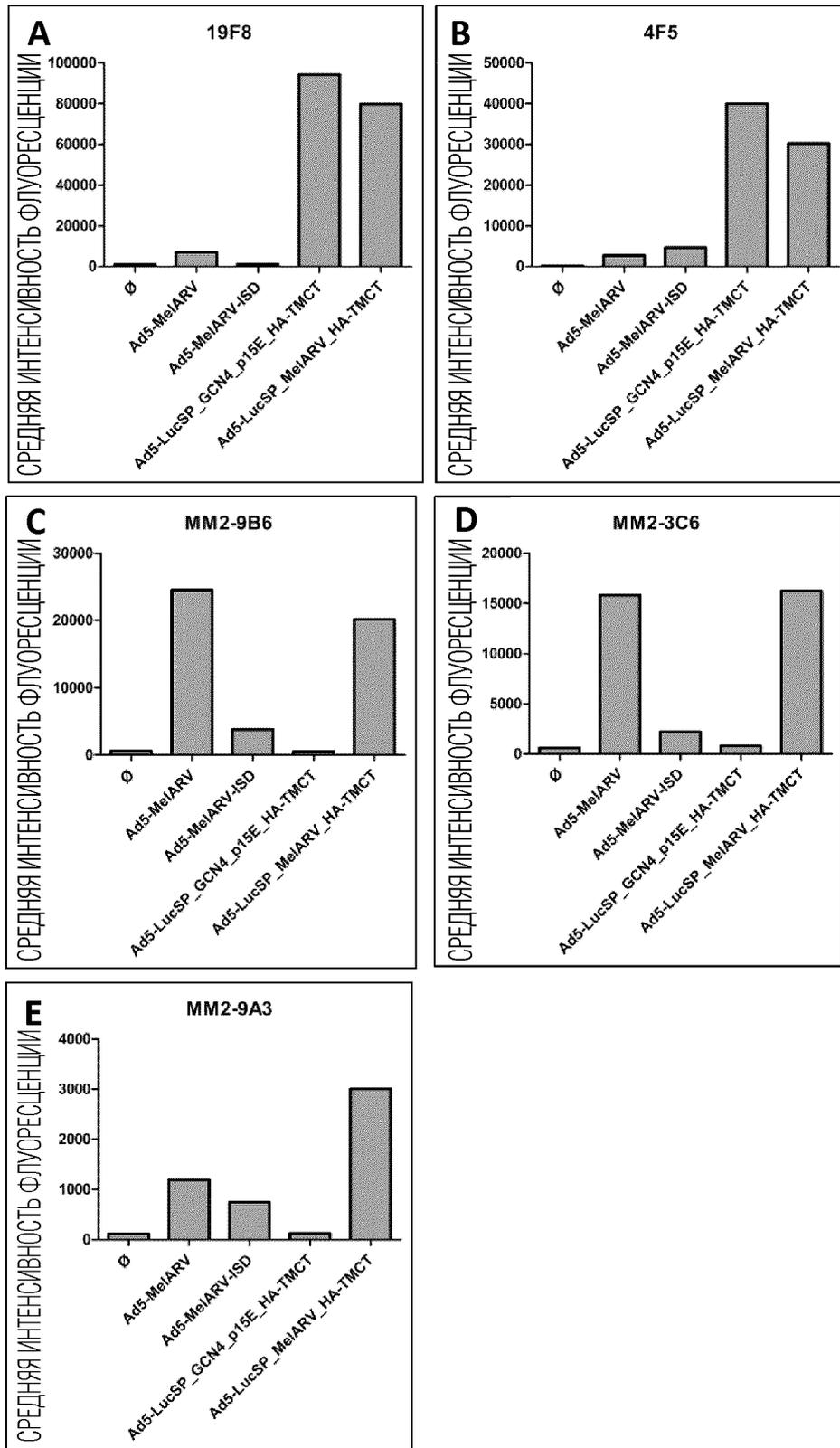
Модифицированный Env MelARV (Ad5-LucSP_MelARV_Ha-TMCT)



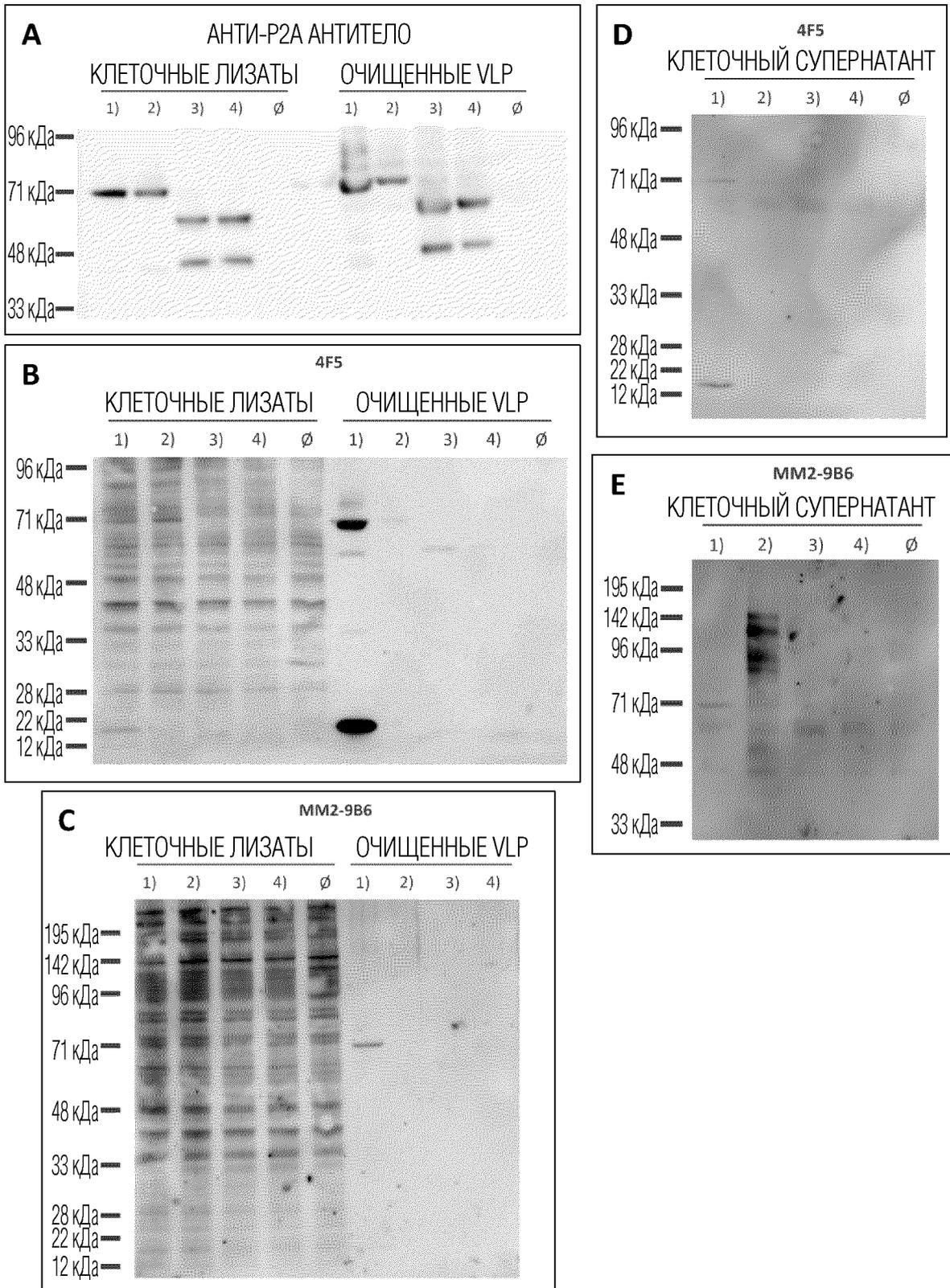
Модифицированный p15E MelARV (Ad5-LucSP_GCIN4_p15E_Ha-TMCT)



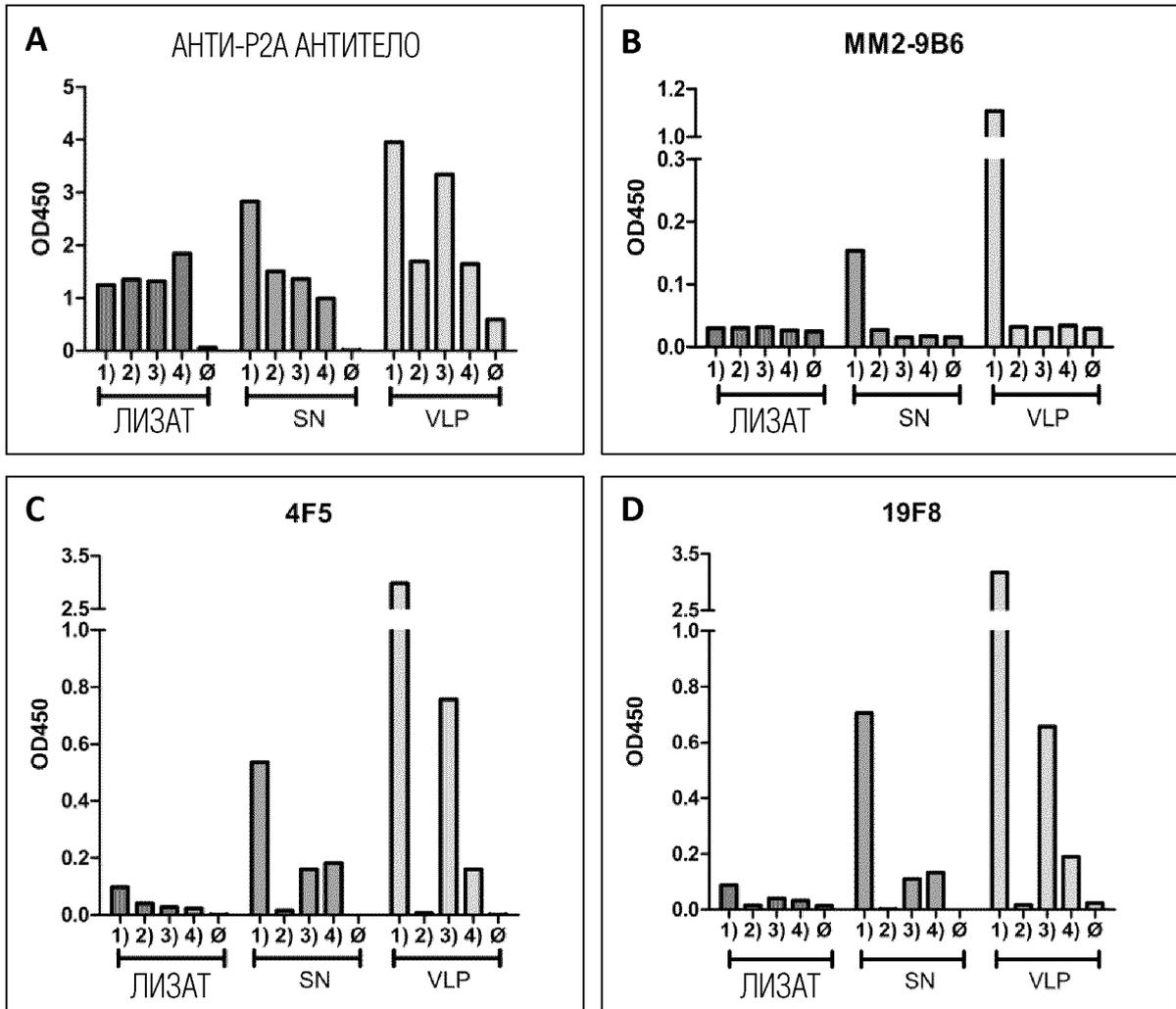
ФИГ. 16



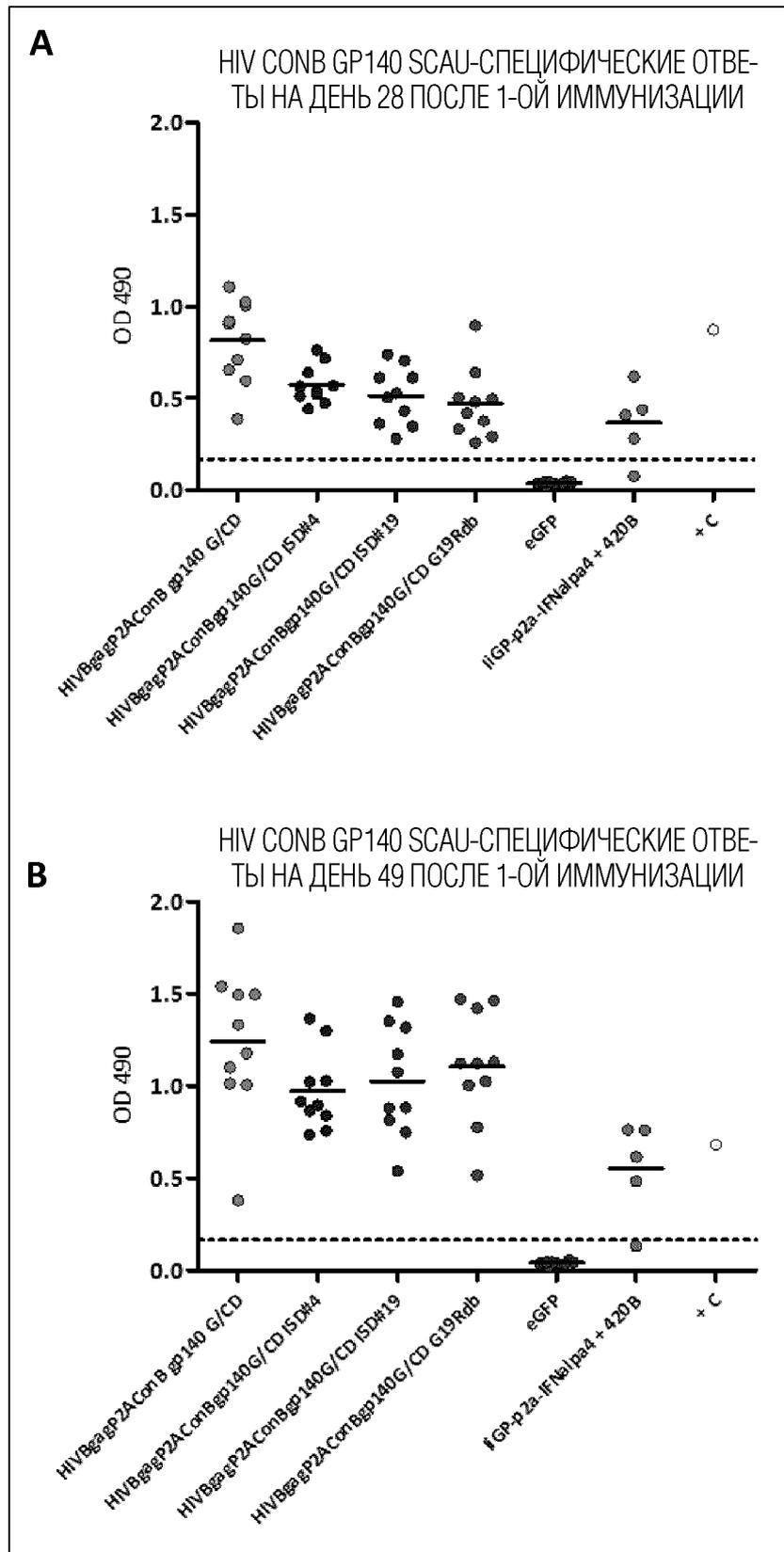
ФИГ. 17



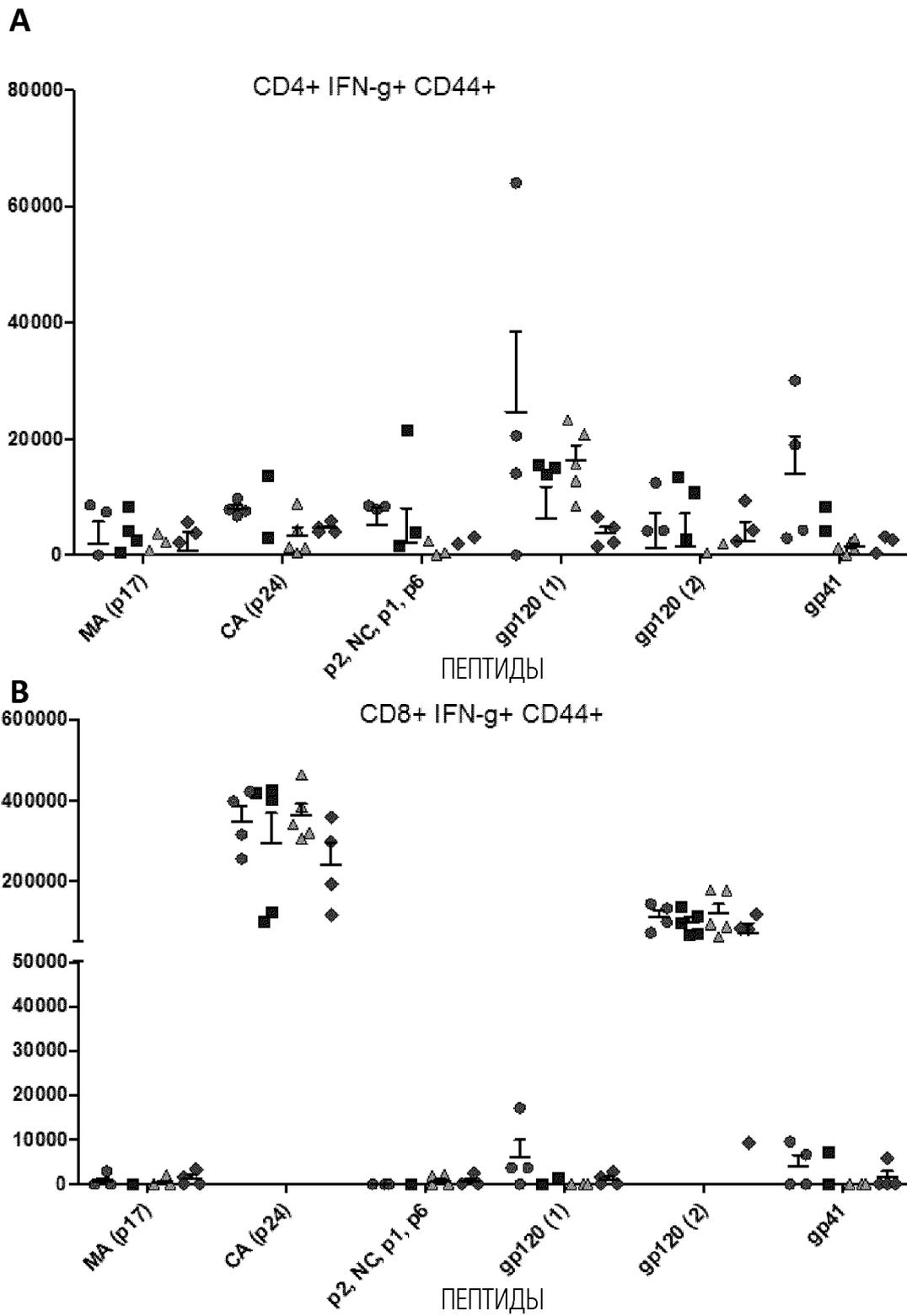
ФИГ. 18



ФИГ. 19

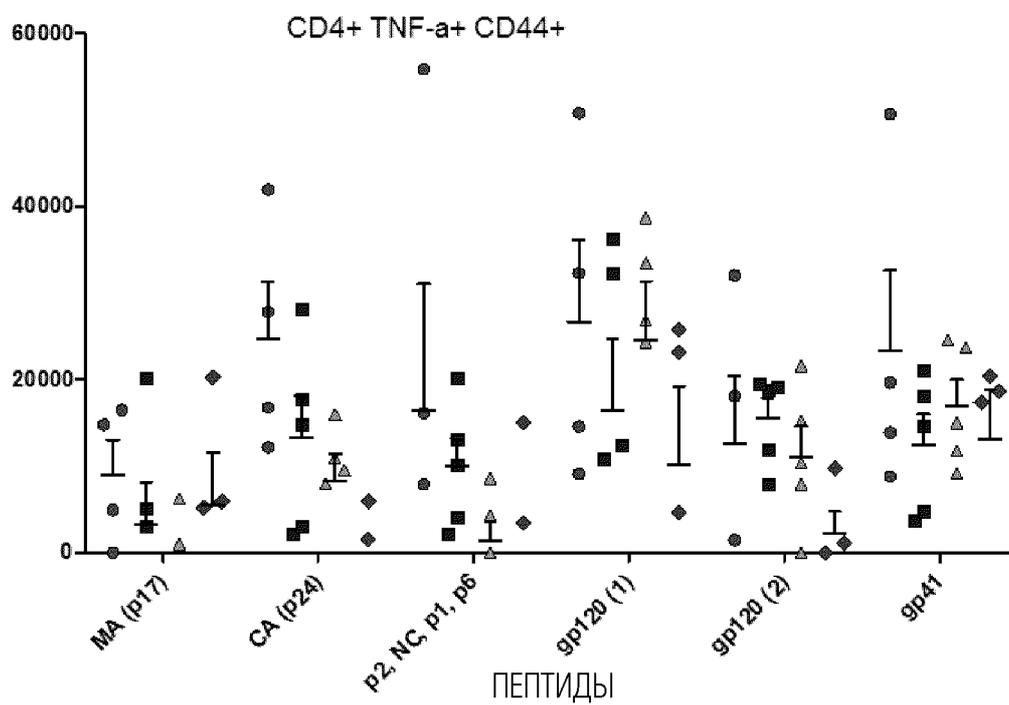


ФИГ. 20

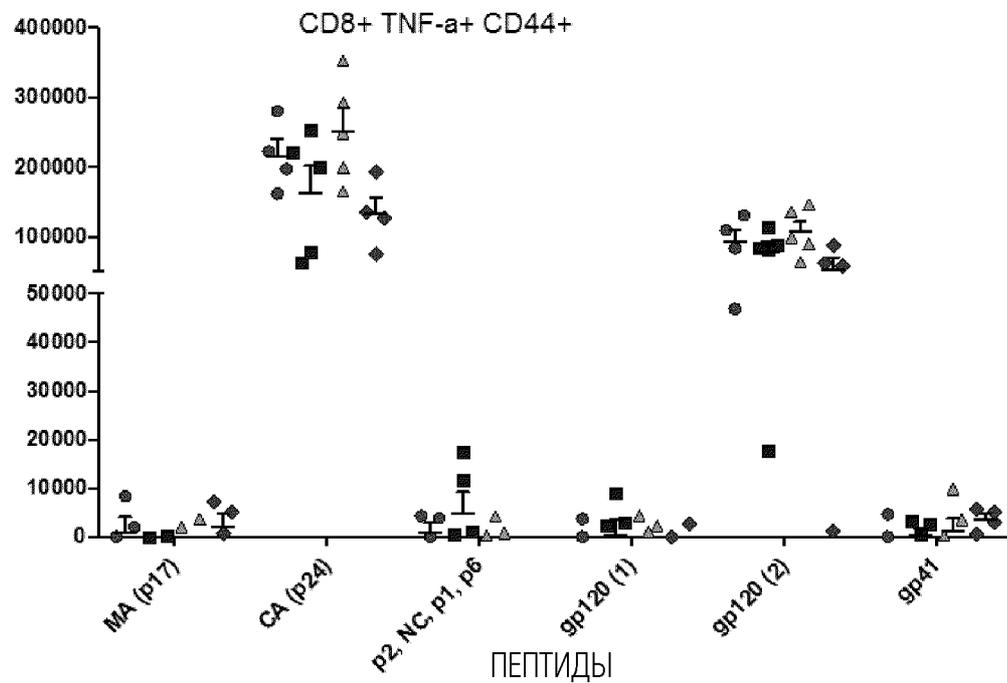


ФИГ. 21

C



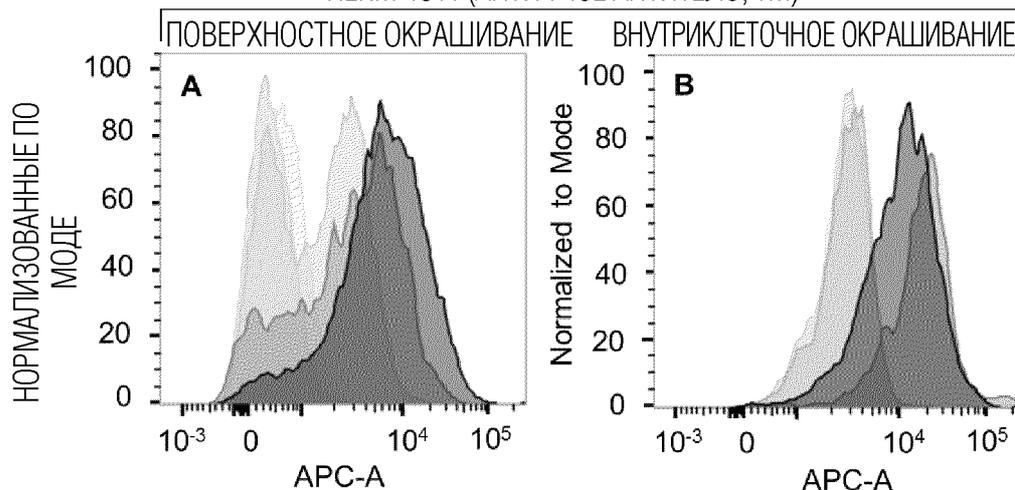
D



ФИГ. 21 (продолжение)

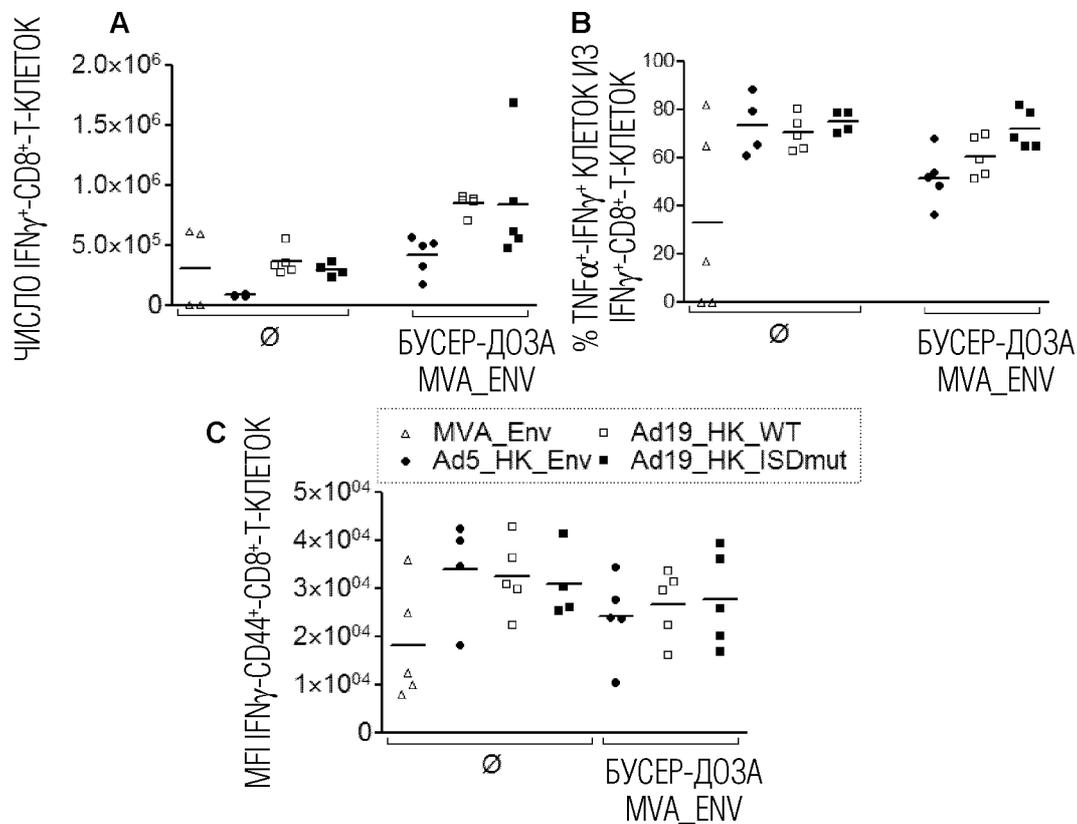
22/24

HERM-1811 (АНТИ-P15Е АНТИТЕЛО, ТМ)



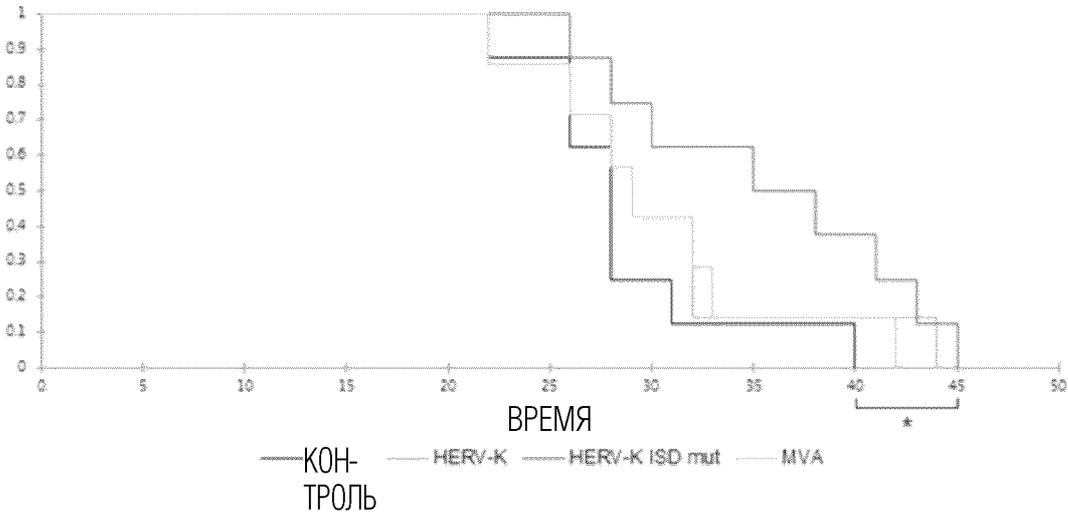
ОБРАЗЦЫ	
	Ad19_HERV-K_ISD mut
	Ad19_HERV-K_WT
	Ad5_HERV-K_Env
	НЕРЕЛЕВАНТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ AD5
	НЕИНФИЦИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ

ФИГ. 24

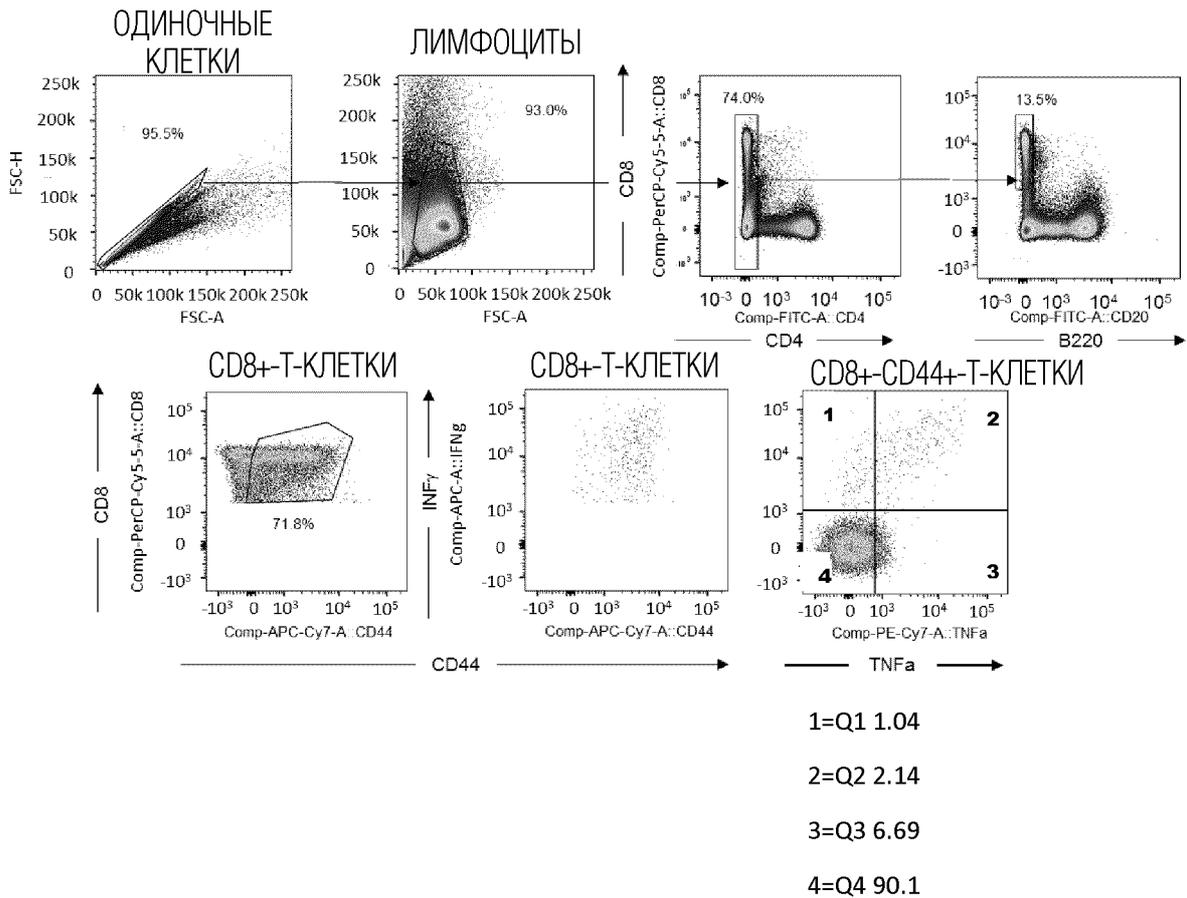


ФИГ. 25

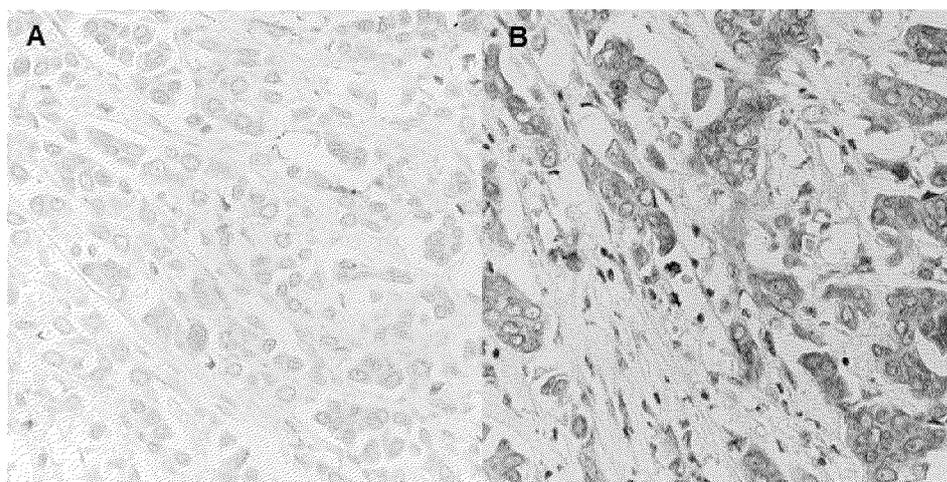
ФУНКЦИЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ВЫЖИВАЕМОСТИ



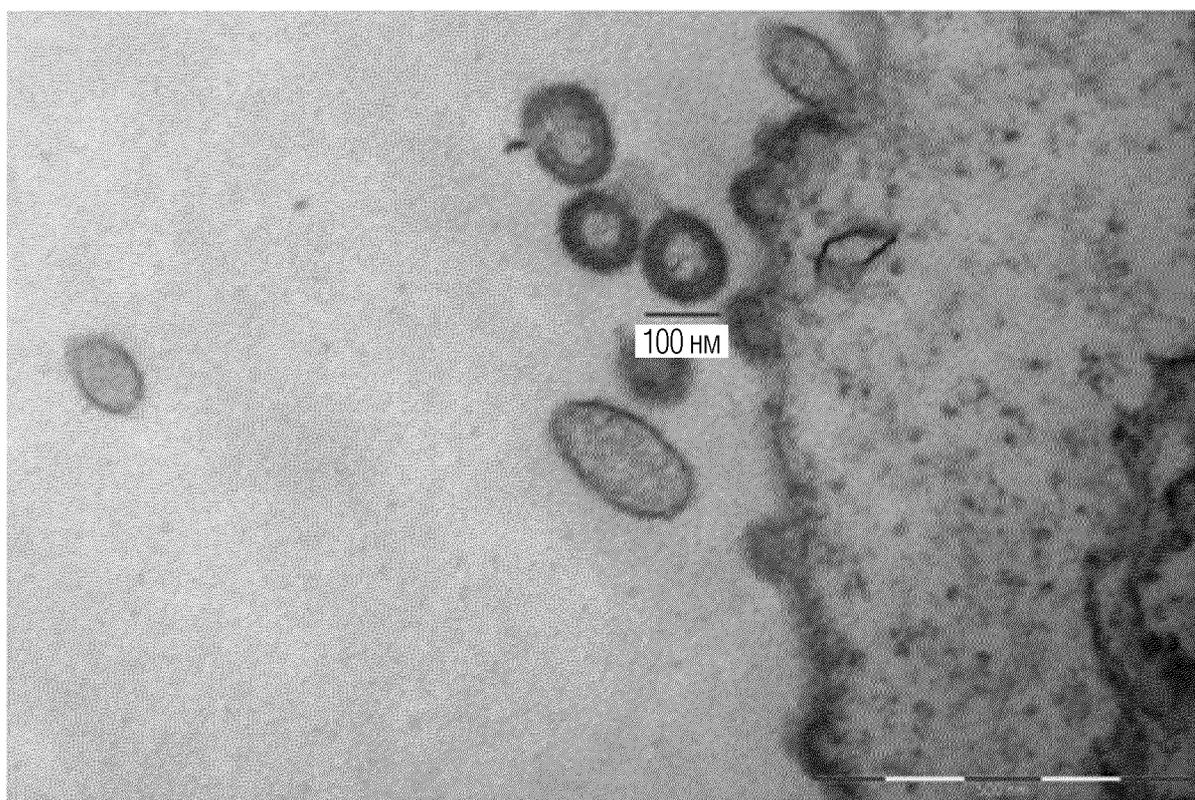
ФИГ. 26



ФИГ. 27



ФИГ. 28



ФИГ. 29